

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-508023

(P2003-508023A)

(43) 公表日 平成15年3月4日 (2003.3.4)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 P 7/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00		7/04	4 B 0 6 4
A 6 1 P 7/00		25/00	4 B 0 6 5
7/04		31/12	4 C 0 8 4
25/00		35/00	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全123頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-509211(P2001-509211)	(71) 出願人	ボルダーク バイオテックノロジー、 インコーポレイテッド
(86) (22) 出願日	平成12年7月13日 (2000.7.13)		アメリカ合衆国 コロラド 80027, ルイビル, ウェスト ウィロー ストリート 678
(85) 翻訳文提出日	平成14年1月15日 (2002.1.15)	(72) 発明者	コックス、ジョージ エヌ、ザ サード
(86) 国際出願番号	P C T / U S 0 0 / 1 9 3 3 6		アメリカ合衆国 80027 コロラド州 ルイビル ウェスト ウィロー ストリート 678
(87) 国際公開番号	W O 0 1 / 0 0 3 7 3 7	(72) 発明者	ドーアティ、ダニエル エイチ、
(87) 国際公開日	平成13年1月18日 (2001.1.18)		アメリカ合衆国 80303 コロラド州 ボールダー イサカ ドライブ 719
(31) 優先権主張番号	6 0 / 1 4 3 , 4 5 8	(74) 代理人	弁理士 恩田 博宣 (外1名)
(32) 優先日	平成11年7月13日 (1999.7.13)		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫グロブリン融合タンパク質

(57) 【要約】

本発明は、免疫グロブリンドメインに融合したサイトカインまたは増殖因子を含む融合タンパク質を作成する新規な方法に関する。増殖因子/サイトカインは免疫グロブリンドメインに対して、直接融合するかペプチドリンカーを介して融合することができる。この新規な方法によって生産された、精製増殖因子/サイトカイン I g G 融合タンパク質は、生物活性があり、融合していない増殖因子/サイトカインが有効に作用する病気を治療するために使用することが可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】免疫グロブリン(Ig)ドメインに直接つながれた可溶性タンパク質を含む融合タンパク質であって、該可溶性タンパク質が、増殖因子、IL-10ではないサイトカイン、またはそれらの活性変異型である、融合タンパク質。

【請求項2】ペプチドリンカーによって免疫グロブリンドメインの断片につながれた第1のタンパク質を含む融合タンパク質であって、前記ペプチドリンカーはAspProGluまたはSerではなく、可溶性タンパク質が増殖因子またはサイトカインである、融合タンパク質。

【請求項3】ペプチドリンカーがSerGlyである、請求項2に記載の融合タンパク質。

【請求項4】ペプチドリンカーがSer(GlyGlySer)_nであり、nが1～7である、請求項2に記載の融合タンパク質。

【請求項5】ペプチドリンカーがSer(GlyGlySer)またはSer(GlyGlySer)₂である、請求項2に記載の融合タンパク質。

【請求項6】IgドメインがIgG-Fc、IgG-C_HまたはIgG-C_Lである、請求項1～5に記載の融合タンパク質。

【請求項7】可溶性タンパク質が成長ホルモン(GH)超遺伝子ファミリーのメンバーである、請求項1～6に記載の融合タンパク質。

【請求項8】前記メンバーが顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)である、請求項7に記載の融合タンパク質。

【請求項9】融合タンパク質が約300ng/ml未満のEC₅₀を有している、請求項8の融合タンパク質。

【請求項10】G-CSFのシステイン-17がセリンと置き換えられた、請求項8の融合タンパク質。

【請求項11】前記メンバーが約1,000ng/ml未満のEC₅₀を有している、請求項7に記載の融合タンパク質。

【請求項12】前記メンバーがEPOまたはGHである、請求項11に記載の融合タンパク質。

【請求項13】前記メンバーが約1,000 ng/ml未満のEC₅₀を有するα-インターフェロンである、請求項7に記載の融合タンパク質。

【請求項14】前記メンバーがβ-インターフェロン、γ-インターフェロン、GM-CSF、IL-11、TPO、SCFまたはFlt3リガンドである、請求項7に記載の融合タンパク質。

【請求項15】ペプチドリンカーを用いずにつながれた2以上のGH超遺伝子ファミリーのメンバーを含む多量体融合タンパク質。

【請求項16】少なくとも1つのペプチドリンカーによりつながれた2以上のGH超遺伝子ファミリーのメンバーを含む多量体融合タンパク質。

【請求項17】前記メンバーがG-CSFである、請求項15～16に記載の多量体融合タンパク質。

【請求項18】多量体融合タンパク質は二量体G-CSF融合タンパク質である、請求項17に記載の多量体融合タンパク質。

【請求項19】前記メンバーがEPOである、請求項15～16に記載の多量体融合タンパク質。

【請求項20】多量体融合タンパク質が二量体EPO融合タンパク質である、請求項19に記載の多量体融合タンパク質。

【請求項21】前記メンバーが、成長ホルモン、α-インターフェロン、β-インターフェロン、γ-インターフェロン、GM-CSF、IL-11、TPO、SCF、Flt3リガンド、またはそれらの組み合わせである、請求項15～16に記載の多量体融合タンパク質。

【請求項22】ペプチドリンカーがSerGlyである、請求項16～21に記載の融合タンパク質。

【請求項23】ペプチドリンカーがSer(GlyGlySer)_nであり、nが1～7である、請求項16～21に記載の融合タンパク質。

【請求項24】単量体のIg融合タンパク質が本質的に存在しない精製二量体Ig融合タンパク質であって、二量体Ig融合タンパク質が、増殖因子、サイトカインまたはそれらの活性変異型と、Igドメインとから成る、精製二量体Ig融合タンパク質。

【請求項25】増殖因子がG-CSFまたはEPOである、請求項24に記載の精製二量体のIg融合タンパク質。

【請求項26】請求項1～25に記載のIg融合タンパク質を生産する方法であって、

(a) 増殖因子、サイトカインまたはそれらの活性変異型とおよびIgドメインとをコードする少なくとも1つの核酸で、宿主細胞を形質移入または形質転換する工程と；

(b) 宿主細胞を培養する工程と；

(c) 宿主細胞によって発現されたIg融合タンパク質を収集する工程と；から成る方法。

【請求項27】前記核酸が、さらにペプチドリinkerをコードしている、請求項26に記載の方法。

【請求項28】請求項1～25に記載のIg融合タンパク質をコードする核酸。

【請求項29】Ig融合タンパク質を発現可能な、請求項28の核酸で形質移入または形質転換した宿主細胞。

【請求項30】宿主細胞が真核細胞である、請求項29に記載の宿主細胞。

【請求項31】真核細胞が哺乳類細胞である、請求項30に記載の宿主細胞。

【請求項32】請求項1～25の融合タンパク質を精製する方法であって、

(a) 融合タンパク質を含有する組成物を得る工程と；

(b) カラムクロマトグラフィーにより混在物質から融合タンパク質を分離する工程と；から成る方法。

【請求項33】サイズクロマトグラフィーによって融合タンパク質を混在物質から分離する、請求項32に記載の方法。

【請求項34】GH超遺伝子ファミリーのメンバーにより治療可能な症状を治療する方法であって、有効量の請求項1～25に記載の融合タンパク質を、それを必要とする患者に投与する工程から成る方法。

【請求項35】融合タンパク質はG-C S F-I g 融合タンパク質であり、前記症状は血液中の好中球の欠乏である、請求項34に記載の方法。

【請求項36】融合タンパク質はE P O-I g 融合タンパク質であり、前記症状はヘマトクリットの欠乏である、請求項34に記載の方法。

【請求項37】請求項1～25に記載のI g 融合タンパク質を薬学的に許容可能な担体中に加えた状態で含有する医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の属する技術分野)

本発明は、一般にキメラタンパク質を作成する方法に関し、より詳細には、組換え免疫グロブリン融合タンパク質を作成する方法に関する。

【0002】

(発明の背景)

タンパク質製剤の循環半減期の延長は、患者およびヘルスケア供給者にとっての関心事である。長期作用型タンパク質治療物質は、注入の回数を少なくすべきであると共に、より短い循環半減期を有するタンパク質よりも低用量で有効であり得る。腎臓によるタンパク質の除去を防止することでタンパク質の有効径を増大させると、その循環半減期が増加し得ることが知られている(Knaufら、1988; Mahmood, 1998)。タンパク質の有効径を増大させるのに使用可能な1つの方法は、組換えDNA技術を使用して、問題のタンパク質を別のタンパク質に共有結合で融合することである。大きな融合タンパク質は非融合タンパク質よりも長い循環半減期を有していることが多い(Caponら、1989; Zengら、1995)。融合タンパク質を作成するために頻繁に使用されるタンパク質の1つのクラスは免疫グロブリン(Ig)であり、免疫グロブリンは血液の主な成分である。免疫グロブリンはIgG、IgM、IgA、IgDおよびIgE(Roittら、1989)として知られている様々なクラスで生じる。ヒトIgGはさらにIgG1、IgG2、IgG3、IgG4という、様々なタイプに分けることができる。これらのIgGは別個の遺伝子産物である。IgG1は血清中で最も一般的な免疫グロブリンであり(IgG全体の70%)、21日の血清半減期を有する(Caponら、1989; Roittら、1989)。それほど量は多くないが、IgG4も21日という長い循環半減期を有している(Roittら、1989)。

【0003】

ヒトIgGは、2つの重鎖にジスルフィド結合された2つの軽鎖から成る多重ドメイン構造を有している(本明細書では「四量体」と称する; Roittら、

1989に概説)。各軽鎖および各重鎖は、定常領域とつながれた可変領域を含んでいる。可変領域は、軽鎖と重鎖のN末端の端部に位置する。重鎖の定常領域は、CH1、ヒンジ、CH2およびCH3ドメインにさらに分けられる。CH1、CH2およびCH3ドメインは特有の構造へと折り重なる別個のドメインである。ヒンジ領域はかなりの柔軟性を持つ領域である。ヒンジの柔軟性はIgAアイソタイプに依存して変化し得る(Oiら、1984; Danglら、1988)。IgG重鎖は通常、ヒンジ領域にあるシステイン残基によってジスルフィド結合した二量体を形成する。様々な重鎖ドメインが、IgG遺伝子中の異なるエクソンによってコードされている(Elisonら、1981; 1982)。

【0004】

これまでにタンパク質は、可変領域と定常領域の接合点で(従って本明細書でIgG-C_H融合物と称するCH1-ヒンジ-CH2-CH3ドメインを含む)、CH1とヒンジドメインの接合点で(従って本明細書でIgG-F_c融合物と称するヒンジ-CH2-CH3ドメインを含む)、および重鎖のC末端で(本明細書でIgG-C末端融合物と称する)IgG、IgGの重鎖の定常領域と融合されている。

【0005】

IgG融合タンパク質は、細胞表面受容体の細胞外ドメインに関して最も頻繁に作成されてきた(ChamowおよびAshkenaki、1996に概説)。組換えDNA技術を使用してヒトまたはマウスIgGのC_HまたはF_cのドメインと結合された細胞表面受容体の細胞外ドメインの例としては、CD4(Caponら、1989)、腫瘍壊死因子受容体(Mohlerら、1993)、CTL A4(Linsleyら、1991a)、CD80(Linsleyら、1991b)およびCD86(モートンら、1996)が挙げられる。受容体の細胞外ドメインは他のアミノ酸(つまり受容体の膜貫通ドメインおよび細胞内のドメイン)に対して融合された時に機能するよう発展したため、細胞外ドメインがIgGドメイン等の他のタンパク質ドメインへ融合された時に細胞外ドメインが自身のリガンド結合特性を保持していることは驚くことではない。にもかかわらず、特定の細胞外ドメインに関するリガンド結合特性の差が示されてきた。例えば、

ヒトIgG1-C_Hに対するCD4の細胞外ドメインから構成された融合タンパク質では、CD4リガンドgp120に対して、非融合CD4よりも2倍親和性が減小している(Caponら、1989)。

【0006】

IgGドメインに融合されて十分な生物活性を保持する、例えば増殖因子、サイトカイン、およびその同等物のような通常可溶性のタンパク質のさらに少数例がある。可溶性タンパク質は他のタンパク質に融合された時に機能するようには発展しなかったため、可溶性タンパク質が他のタンパク質に融合された時に、生物活性を保持すると予想する論拠はない。実際、多くの公表された例において、融合サイトカイン/増殖因子の生物活性は、非融合サイトカイン/増殖因子に対して大いに減小した。別のタンパク質に融合された時にサイトカイン/増殖因子が適切に機能するかどうかは多くの要因によって左右されるが、それには、サイトカイン/増殖因子のアミノ末端またはカルボキシ末端がタンパク質の表面に露出されているかどうか、そのような領域がサイトカイン/増殖因子の生物活性にとって重要であるかどうか、また、別のタンパク質に融合された時にサイトカイン/増殖因子が適切に折り重なることができるかどうか、ということが挙げられる。まさにその性質により、そのような要因は、非常にタンパク質特異的であり、かつ予測不能である。調べたいいくつかの増殖因子/サイトカイン融合タンパク質に関する結果から、融合タンパク質のタンパク質特異的な生物活性がいかなるものであるかが示された。多数のケースでは融合増殖因子/サイトカインの生物活性が劇的に減小するが、少数のケースでは増殖因子/サイトカインの生物活性が十分に保持される。融合タンパク質の生物活性が著しく減小したあるケースにおいて、サイトカイン/増殖因子とIgGドメインの間の接合点でアミノ酸を修飾すると、生物活性が改良された融合タンパク質が得られた(Chenら、1994)。この同じ修飾は、同じIgGドメインに融合された別のサイトカインの生物活性は改良しなかった。[(Chenら、1994)。

【0007】

これまでにIgGに融合された増殖因子には、セラチン生成細胞増殖因子(KGF)、繊維芽細胞増殖因子(FGF)およびインシュリン様増殖因子(IGF

ーI)が含まれる。KGFマウスIgG1-Fc融合タンパク質が、La Roche helieら(1995)により作成された。インビトロバイオアッセイでBa1b/MK細胞の増殖を刺激した際、モル基準で、融合タンパク質は、KGFよりも4~5倍活性が低かった。また、KGF-IgG-Fc融合物は、KGFよりも、KGF受容体に対する親和性が約10倍低かった。繊維芽細胞増殖因子-ヒトIgG-Fc融合物が、Dikovら(1998)により作成された。NIH 3T3細胞のDNA合成を刺激した際、モル基準で、FGF-IgG1-Fc融合タンパク質は、インビトロアッセイでFGFよりも活性が約3倍低かった。ShinおよびMorrison(1990)は、IGF-IをIgGのC末端に融合し、IGF-I-IgG C末端融合タンパク質が、IGF-Iの1%未満のインビトロ生物活性を有することを見出した。

【0008】

これまでにIgGドメインへ融合されたサイトカインの例には、IL-2、IL-4、IL-10およびGM-CSFが含まれる。Landolphi(1991; 1994)は、IL-2のC末端とIgG-C_HドメインのN末端との間に余分なセリンを含む、IL-2-IgG1-C_H融合タンパク質について記述した。IL-2-IgG1-C_H融合タンパク質はインビトロバイオアッセイにおいてモルベースでIL-2と同程度に活性であると評されているが、いかにタンパク質濃度の量を測定したかに関しての詳細な説明が提供されていなかった(Landolphi, 1991; 1994)。Zengら(1995)はマウスIL-10をIgG2aのFc領域に直接融合させたが、Fcヒンジ領域の第1アミノ酸がGluからAspに変更された。Zengら(1995)は、IL-10-IgG2a融合タンパク質がインビトロバイオアッセイにおいて十分な活性を有すると報告したが、融合タンパク質の2つの濃度だけが調べられたにすぎず、それらはいずれも飽和状態であった。このようにタンパク濃度が高いと、IL-10-マウスIgG2a融合タンパク質とIL-10と間の生物活性の大きな差(例えば100倍)しか検知することができなかった。生物活性のより小さな差を検出するためには、インビトロバイオアッセイでタンパク質の連続希釈物を分析し、EC₅₀(最大量の半分の刺激に必要なタンパク質の濃度)またはI

C₅₀ (最大の半分の阻害に必要なタンパク質の濃度)を算出する必要がある。IL-10-IgG2aおよびIL-10のEC₅₀は、Zhengら(1995)によっては報告されなかった。Chenら(1994)もIL-2-IgG融合タンパク質を構成し、この融合タンパク質の活性が十分であると報告した。Gilliesら(1993)も、抗ガングリオシドIgG抗体のC末端にIL-2を融合させて含む十分に活性があるIL-2融合タンパク質の作成を報告した。Gilliesら(1993)は期せずして同じ抗体とGM-CSFとの間の融合が野生型GM-CSF生物活性の約20%を示すにすぎないことを見出した。Chenら(1994)は、抗体分子とGM-CSFの間に4つのアミノ酸を挿入することにより、十分に活性のあるIgG C末端-GM-CSF融合タンパク質を作成することができた。Chenらは期せずして、同じ4つのアミノ酸から成るリンカーを使用してIL-4を同じ抗体に融合させた結果、IL-4タンパク質の生物活性が25倍減少すると報告した(Chen, 1994)。

【0009】

Quiら(1998)は、3~7のグリシン残基から成る柔軟なペプチドリンカーを使用して2つのEPOタンパク質をひととめに融合したホモ二量体エリスロポエチン(EPO)タンパク質について記述した。このペプチドリンカーは、1つのEPOタンパク質のC末端を、別のEPOタンパク質のN末端につないだ。この融合タンパク質のインビトロ生物活性は、野生型EPOと比較すると著しく減少した(少なくとも4~10倍)(Quiら, 1998)。

【0010】

従って、上記文献は、増殖因子/サイトカインドメインとIgGドメインとの間の接合点におけるアミノ酸が増殖因子/サイトカインの生物活性に深い影響を及ぼしうることを示している。

【0011】

人の治療用物質として使用する場合、増殖因子/サイトカイン-IgG融合タンパク質の生物活性はできるだけ野生型(つまり非融合タンパク質)に近いことが望ましい。活性の高い融合タンパク質は、特異的活性が低い融合タンパク質よりも低用量でより大きな治療上の利点を生むことが可能である。これは薬のコス

トを下げ、患者により大きな治療上の利点を与えるだろう。人の治療用物質として使用する場合、タンパク質ができるだけ均質かつ純粋であることも有益である。Ig 融合タンパク質は単量体として合成され、該単量体は融合タンパク質のタイプに依存して、ジスルフィド結合した二量体および四量体を形成するよう組立てることが可能である。単量体、二量体および四量体の相対比率は製造条件に依存して、ロットごとに変更し得る。ロットごとに可変にすると、活性を変えた異種混合生成物を得ることができる。サイズがより大きいため、四量体は二量体や単量体よりも体内で長い循環半減期を有すると予想され、二量体は単量体よりも長い循環半減期を持つと予想される。このため、四量体、二量体および単量体は、インビボで異なる治療効果を生じ得る。四量体、二量体または単量体の精製した均質調製物は、明確な特効のある特異的活性を有するため、治療用物質として好ましい。人の治療用物質として使用する場合、増殖因子/サイトカインドメインをIg ドメインにつなげる任意のリンカー配列の長さを、リンカー配列中の非天然アミノ酸への免疫応答を進展させる可能性を低減させる最小長さに保つことはさらに有益であり得る。本明細書で「直接融合」と称する、介在リンカー配列を用いない2つのタンパク質の連結は、非天然リンカーに対する免疫応答発展の可能性をなくすため、Ig 融合タンパク質の1つの好ましい形式である。

【0012】

Ig 融合タンパク質に関する文献は、「直接でない」サイトカイン/増殖因子-Ig 融合タンパク質（つまり増殖因子/サイトカインがペプチドリンカーを介してIg ドメインにつながれている融合タンパク質）の製造例しか提供していない。WO第99/02709号は、EPOタンパク質をコードするDNA配列とIg ドメインタンパク質をコードするDNA配列をつなげるためにBamHI制限酵素部位を使用することにより、Ig ドメインにEPOをつなぐ例を提供する。この方法を使用して、リンカーを含むEPO-Ig 融合タンパク質を作成することが可能である。BamHIは、EPOまたはIg-Fc、Ig-CHもしくは軽鎖定常領域の接合点に存在していない特異的DNA認識配列であるGGATCCを有するため、この方法はEPO-Igの直接融合物を作成するのに有効ではない。

【0013】

EP第0464533A号は、サイトカインとIgドメイン間に3つのアミノ酸から成る特異的リンカー（AspProGlu）を含むIg融合タンパク質を作成する例を提供する。EP第0464533A号に記述された方法は、融合タンパク質を作成するために、サイトカインおよびIgドメインをコードする別個のエクソンをRNAスプライシングすることに基づいている。RNAスプライシング反応ではスプライス部位に特異的配列が必要であるために、AspProGluリンカーがサイトカイン／増殖因子コード領域の終端に必要とされた。AspProGluリンカーは、RNAスプライシングの発生を可能にするヌクレオチドによってコードされる。EP第0464533A号はこの方法を使用してAspProGluリンカーを含むEPO-Ig融合タンパク質を作成する例を提供する。EPOコード領域は、Arg166を削除し、EPOコード配列のAsp165の直後にアミノ酸リンカー（ProGlu）を付加するように修飾した。これにより、AspProGluリンカー（EPOコード配列のAsp165はリンカー配列のAspを提供した）を含むEPO-Ig融合タンパク質が作成された。従って、EP第0464533Aによって記述された方法は、Igの直接融合物またはAspProGluやProGluリンカーを含まないIg融合物の作成には有効でない。

【0014】

米国特許第5,349,053号は、IL-2とIgドメインとの間にSerリンカーを含むIL-2-IgG-C_H融合タンパク質の作成方法について記述している。米国特許第5,349,053号に記述された方法は、IL-2およびIgG-C_Hドメインをコードする別個のエクソンのRNAスプライシングに基づいている。RNAスプライシング反応ではスプライス部位に特異的配列が必要であるため、IL-2コード領域のカルボキシ末端にセリンをコードするTCAを付加するようにIL-2のコード領域を修飾する必要がある。TCAコドンはいントロンスプライス連結配列が後続するように作成された。これにより、Serリンカーを含むIL-2-IgG-C_H融合タンパク質が作成された。米国特許第5,349,053号に記述された方法は、サイトカイン／増殖因子-

I gの直接融合物またはSerリンカーを含まないサイトカイン／増殖因子-I g融合物の作成には有効でない。

【0015】

EPO-I g GおよびG-CSF-I g G融合タンパク質を始めとする増殖因子／サイトカイン-I g G融合タンパク質が、EP第0464533A、WO第99/02709号およびLandolphi (1991; 1994)において想定されている。これらの文献はいずれも、その想定されたEPO-I g GおよびG-CSF-I g G融合タンパク質の発現、精製および生物活性に関するいかなるデータも示していない。Landolphi (1991; 1994)はIL-2-I g G1-C_H融合タンパク質に関する生物活性データを示したが、他のI g G融合タンパク質に関するものは示さなかった。EP第0464533Aによって想定されたEPO-I g G1-Fc融合タンパク質は、EPOコード配列のAsp165とI g G1-Fcヒンジ領域の開始点との間に2つのアミノ酸から成るリンカー(ProGln)を含んでいる。EPOのカルボキシ末端アミノ酸であるArg166は削除されるだろう。EP第0464533A号は、G-CSFコード領域がI g G1-Fcヒンジ領域にどのようにつながれるかに関して何ら情報を提供していない。EP第0464533号はいかなるタンパク質に対する生物活性データも提供していない。WO第99/02709号はI g G1-FcマウスI g G2a-Fc融合タンパク質について記述しているが、EPO-ヒトI g G融合タンパク質については記述していない。EPO-マウスI g G2a-Fc融合タンパク質に対する生物活性データは示されていない。WO第99/02709号は、想定融合タンパク質を構成するのに使用したEPOcDNAやヒトI g G遺伝子の入手源あるいはEPOをI g Gドメインに連結するのに使用される正確なアミノ酸についての詳細を提供していない。WO第99/02709号に引用された文献(Steurerら、1995)もそのような情報を提供していない。

【0016】

WO第99/02709号は、EPOをI g Gドメインにつなぐために1~20個のアミノ酸から成る柔軟なペプチドリンカーを使用することができると仮定し

ている。しかしながら、WO第99/02709号では、柔軟なリンカーを作成するために使用されるアミノ酸が特定されてない。Qiur (1998) は、3～7個のグリシン残基から成る柔軟なリンカーによって連結されたEPO融合タンパク質では、野生型EPOに対して生物活性が著しく減小する(4～10倍)と報告した。

【0017】

WO第99/02709号は、仮説EPO-IgG融合タンパク質をコードするプラスミドで形質移入したCOS細胞由来の馴化培地を使用して、マウスのヘマトクリットを増加させる方法を提供する。そのような馴化培地は、単量体および二量体のEPO-IgG融合タンパク質の混合物のみならず、他の多くのタンパク質を含むだろう。WO第99/02709号は、教示された方法が有効であることを実証する証拠を提供していない。

【0018】

このように、相当な努力にもかかわらず、増殖因子/サイトカイン-Ig融合タンパク質を、直接的にまたはIg融合タンパク質の増殖因子/サイトカインドメインの生物活性を保存する様々なリンカー種を用いて作成する方法が未だ要求されている。本発明はこの要求を満たし、関連する利点を提供する。

【0019】

(発明の概要)

本発明は、可溶性タンパク質がIgドメインに直接つながれるか、もしくはAspProGluまたはSerでないアミノ酸リンカーによってつながれる、新規なIg融合タンパク質を開示する。可溶性タンパク質は、増殖因子、サイトカイン、もしくは増殖因子またはサイトカインの変異型である。有用なリンカーは、グリシン残基とセリン残基の混成物、好ましくはSerGlyおよびSer(GlyGlySer)_n (配列番号1)を有し、nは1～7である。Igドメインは好ましくは定常領域を含んでおり、IgG-Fc、IgG-C_HまたはC_Lから好ましくは選択される。直接融合としてまたはこれらのリンカー配列を介してIgドメインにつながれた時に非融合タンパク質の生物活性を実質的に保持する増殖因子およびサイトカイン、ならびにそれらの活性断片の例としては、G-C

SF、EPO、GH、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、 γ -インターフェロン、GM-CSF、IL-11、TPO、SCF、およびFlt3リガンドのような超遺伝子ファミリーが挙げられる。

【0020】

例えば、EPO-IgG-Fc融合タンパク質およびG-CSF-IgG-Fc融合タンパク質は、モル基準で、非融合EPOおよびG-CSFと等価な生物活性を有している。EPOとG-CSFのIgG-C_H融合物は、融合していないEPOとG-CSFの2～4倍のインビトロ生物活性を有している。成長ホルモン-IgG-Fcおよび成長ホルモン-IgG-C_H融合タンパク質は、融合していない成長ホルモンの4～17倍の生物活性を期せずして有している。同様に、IFN- α 2およびIFN- β を用いた生物学的に活性なIgG-Fc、IgG-C_HおよびIg-C_L融合構成物も提供される。

【0021】

EPO、G-CSFおよび成長ホルモンのIgG-Fc融合物は、そのような増殖因子／サイトカインの同じIgG-C_H融合物より活性が高い。IFN- α のIg-C_L融合物は、IFN- α のIgG-FcまたはIgG-C_H融合物よりも活性が高い。IgG-Fc、IgG-C_H、IgG-C_L融合タンパク質間の生物活性に差があることも、予期していないことであった。さらに、融合されたEPO、G-CSF、成長ホルモン、およびIFN- α ドメインの生物活性を最大にするEPO-IgGおよびG-CSF-IgG、成長ホルモン-IgG融合タンパク質の構成のための好ましい部位は、本願で同定された。

【0022】

本発明は、重鎖および軽鎖の融合タンパク質の多量体を含む新規な増殖因子／サイトカイン-Ig融合タンパク質と、単量体の融合タンパク質、凝集物および混在タンパク質が本質的に存在しない二量体の増殖因子／サイトカイン-Ig融合タンパク質の調製物を調製する方法とをさらに提供する。「本質的に存在しない」とは、本明細書では、90%以上の純度であることを意味するように使用される。本発明は、2以上のサイトカイン／増殖因子が、直接融合としてまたはアミノ酸リンカーの使用によりつながれる、新規な多量体増殖因子／サイトカイン

も提供する。

【0023】

様々な症状を治療する方法であって、有効量の本発明のIg融合タンパク質をその治療を必要とする患者に投与する工程から成る方法も提供される。

(発明の詳細な説明)

本明細書に記述した研究において、増殖因子/サイトカイン-Ig融合タンパク質の生物活性が増殖因子/サイトカインを取り付けるIgGドメインのアイソタイプに依存して変化し得ること、およびタンパク質がIg軽鎖に取り付けられるかIg重鎖の定常領域に取り付けられるか、が目下で発見されている。これらの結果は文献からは予測されなかった。いかなる特定の理論に拘束されるものも望んでいないが、発明者は、観察した生物活性の可変性が、柔軟性と、融合タンパク質をつなげるのに使用するIgドメイン領域の他の物理特性とに関連すると仮定している。これらの知見に基づくと、マウスIgドメインを使用して作成された融合タンパク質の生物活性は、ヒトIgドメインを使用して作成された融合タンパク質の生物活性を予言するためには使用することができない。

【0024】

従って、本発明は一般に、Igドメインにつながれた可溶性タンパク質を含むIg融合タンパク質を構成する方法と、そのような方法によって得られた新規なIg融合タンパク質とに関する。該方法は、可溶性タンパク質を、直接融合としてまたはまたは介在アミノ酸リンカーを用いて、Ig融合ドメインにつなげることを伴う。

【0025】

本発明の方法は、EPO、成長ホルモン(GH)、G-CSF、IL-11、トロンボポエチン(TPO)、幹細胞因子、Flt3リガンド、GM-CSFおよびインターフェロン(特に α 、 β および γ -インターフェロン)を含むがそれらに限定されないI又は複数の増殖因子および/またはサイトカインを含むIg融合タンパク質を構成するのに有効である。該方法が有効な他のタンパク質としては、GH超遺伝子ファミリーの他のメンバーがある。GH超遺伝子ファミリーのメンバーには、GH、プロラクチン、胎盤ラクトゲン、エリスロポエチン、ト

ロンボポエチン、インターロイキン-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12 (p35サブユニット)、IL-13、IL-15、オンコスタチンM、毛様体神経栄養因子、白血病抑制因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、 γ -インターフェロン、 ω -インターフェロン、 τ -インターフェロン、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、カルジオトロフィン-1 (CT-1)、幹細胞因子および $f l t 3 / f l k 2$ リガンド (Bazan (1990; 1991; 1992); Mott および Campbell (1995); Silvennoinen および Ihle (1996); Martin ら、1990; Hannum ら、1994) が含まれる。この遺伝子ファミリーのさらなるメンバーが遺伝子クローニングと配列決定によって今後同定されることが予想される。GH超遺伝子ファミリーのメンバーは、それらが限られたアミノ酸配列同一性またはDNA配列同一性を一般に有しているという事実にもかかわらず、類似の二次または三次構造をしている。GH超遺伝子ファミリーのメンバーに共有される構造の特徴がBazan (1990; 1991; 1992)、Mott と Campbell (1995) および Silvennoinen と Ihle (1996) に記述されているが、この特徴は遺伝子ファミリーの新しいメンバーの容易な同定を可能にする。本明細書に記載した方法は、通常可溶であってかつGH超遺伝子ファミリーのメンバーではないタンパク質によりIg融合タンパク質を作成するのににも有用である。そのようなタンパク質の活性変異型も本発明のIg融合タンパク質を構成するのに使用することができる。用語「活性変異型」とは、全長タンパク質の生物活性を実質的に保持する、以下により詳細に記述される可溶性タンパク質の断片のことを意味する。

【0026】

本明細書に開示した方法は、リンカーがAspProGluまたはSerでない限り、任意のアミノ酸配列から成る任意の長さのリンカーを使用して、Igドメインに増殖因子/サイトカインをつなぐために使用することができる。好ましいリンカーは、長さ1〜50のアミノ酸であり、より好ましくは長さ1〜22の

アミノ酸である。好ましくは、リンカーは、増殖因子／サイトカインまたはIgドメインの生物活性に悪影響を及ぼさない。好ましいリンカーは、グリシン残基とセリン残基の混成物を含んでいる。有用なリンカーに組み込むことが可能な他のアミノ酸には、スレオニン残基とアラニン残基が含まれる。本明細書に開示した好ましいリンカーの1つは、2つのアミノ酸から成るリンカーSerGlyである。本明細書に開示する他の好ましいリンカーは、モチーフSer(GlyGlySer)_n (配列番号1) (nは1~7であり得る) から成るリンカーである。

【0027】

本発明のIgドメインは、例えばIgG-Fc、IgG-C_H、のような定常領域を含んでいる、IgG-Fc、IgG-C_H、別のIgクラス(すなわちIgM、IgA、IgE、IgD)由来のFcまたはC_Hのような定常ドメイン、もしくは軽鎖定常ドメインを包含する。これらのドメインの切断物およびアミノ酸変異型または置換型も、本発明に包含される。

【0028】

本発明の別の態様において、IgG-FcおよびIgG-C_H融合タンパク質は、例えば、二量体を形成するよう組み立てることが可能な単量体として合成される。通常、二量体は、IgGヒンジ領域においてジスルフィド結合によりつながられる。IgG融合タンパク質を分泌する細胞由来の馴化培地は、IgG融合タンパク質単量体および二量体の混合物を含み得る。人の治療用物質として使用する場合、2つの形式の混合物ではなく、IgG融合タンパク質単量体か二量体のいずれかの均質な集団を使用することが望ましい。二量体の増殖因子／サイトカインIgG融合タンパク質の本質的に純粋な調製物を得る方法も提供される。該方法は、IgG融合タンパク質を発現することが可能な宿主細胞を得る工程と、馴化培地を収集する工程と、単量体の融合タンパク質、凝集物、および混在タンパク質から、カラムクロマトグラフィー法により二量体の融合タンパク質を精製する工程とにより達成される。IgG融合タンパク質を発現するのに適した宿主細胞には、酵母、昆虫、哺乳類または他の真核細胞が含まれる。好ましくは宿主細胞は哺乳類の細胞、特にCOSまたはCHO細胞である。

【0029】

1実施形態では、EPOが、Ig-Fcドメイン（例えばIgG-Fcドメイン）に直接つながれ、1,000ng/ml未満、好ましくは100ng/ml未満、より好ましくは10ng/ml未満、そして最も好ましくは4ng/ml未満のEC₅₀を有する。別の実施形態では、EPOが、2～7のアミノ酸から成るペプチドリンカーを介してIgG-FcまたはIgG-C_Hドメインに好ましくはつながれ、1,000ng/ml未満、好ましくは100ng/ml未満、より好ましくは10ng/ml未満、そして最も好ましくは4ng/ml未満のEC₅₀を有する。

【0030】

別の実施形態では、G-CSFが、Ig-Fcドメイン（例えばIgG-Fcドメイン）に直接つながれ、300ng/ml未満、好ましくは30ng/ml未満、より好ましくは3ng/ml未満、最も好ましくは300pg/ml未満のEC₅₀を有する。別の実施形態では、G-CSFが、2～7のアミノ酸から成るペプチドリンカーを介してIgG-FcまたはIgG-C_Hドメインに好ましくはつながれ、300ng/ml未満、好ましくは30ng/ml未満、より好ましくは3ng/ml未満、最も好ましくは300pg/ml未満のEC₅₀を有する。

【0031】

別の実施形態では、GHが2～7のアミノ酸から成るペプチドリンカーを介してIg-FcまたはIg-C_Hドメイン（例えばIgG-FcまたはIgG-C_Hドメイン）につながれ、1,000ng/ml未満、好ましくは100ng/ml未満、より好ましくは10ng/ml未満のEC₅₀を有する。

【0032】

別の実施形態では、IFN- α が2～7のアミノ酸から成るペプチドリンカーを介してIg-FcまたはIg-C_Hドメイン（例えばIgG-FcまたはIgG-C_Hドメイン）につながれ、1,000ng/ml未満、好ましくは100ng/ml未満、より好ましくは10ng/ml未満のEC₅₀を有する。

【0033】

別の実施形態では、IFN- α が2~7のアミノ酸から成るペプチドリinkerを介して軽鎖定常領域につながれ、融合タンパク質は100ng/ml未満、好ましくは10ng/ml未満、より好ましくは1ng/ml未満、最も好ましくは100pg/ml未満のIC₅₀を有する。

【0034】

別の実施形態では、IFN- β が2~7のアミノ酸から成るペプチドリinkerを介してIgG-FcまたはIgG-CHドメインにつながれ、10,000ng/ml未満、好ましくは1,000ng/ml未満、より好ましくは100ng/ml未満、および最も好ましくは30ng/ml未満のIC₅₀を有する。

【0035】

ここで、精製GH-、EPO-、およびG-CSF-IgG-CH融合タンパク質は、非融合タンパク質およびIgG-Fc融合タンパク質と比較して、インビトロ生物アッセイでの特異的活性が减小した。本発明はさらに、生物活性が改良された新規な多量体IgG-CH/Ig軽鎖定常ドメイン融合タンパク質に提供する。本発明はさらに、補体を活性化しかつFc受容体と結合するその能力を低下させるようにIgGドメインが変更された増殖因子/サイトカインIgG融合タンパク質にも関する。この目的でのIgGドメインの変更は、実施例6に以下に記述される。

【0036】

新規な多量体増殖因子および/またはサイトカイン融合タンパク質も提供される。1実施形態では、2つ以上の増殖因子および/またはサイトカインが、介在ペプチドリinkerを用いずに互いに直接つながれる。別の実施形態では、2つ以上の増殖因子および/またはサイトカインが1~50のアミノ酸から成るペプチドリinkerを介して、より好ましくは1~7のアミノ酸から成るペプチドリinkerを介して、互いにつながれる。この目的のために特に有用なリンカーには、SerGlyおよびSer(GlyGlySer)_n (配列番号1)が含まれ、nは1~7であり得る。

【0037】

本発明は、対応する全長または野生型のタンパク質または免疫グロブリンの生

物学的特性の一部または全部を有するタンパク質および免疫グロブリンドメインの活性変異型を包含する。そのような変異型には、アミノ酸変異物；アミノ酸置換物；切断物；付加物；炭水化物、リン酸化、または天然タンパク質に見出される他の付着基の変化；ならびに本明細書に示した他の変形物が含まれるが、それらに制限されない。ある場合には、変形物が、本来のタンパク質によって共有されていなかった追加の特性（例えば安定性または生物活性の向上）を有し得る。例えば、マークら（1984）は、位置17のシステインがセリンと置換されたIFN- β 突然変異タンパク質を開示している。IFN- β （Ser-17）の安定性は、野生型IFN- β のそれと比較して向上している。同様に、IL-2のシステイン-125の置換は、より安定したIL-2タンパク質を生じる（Landolph（1991；1994））。Luら（1992）は、位置17のシステインがセリンと置換されたG-CSF突然変異タンパク質を開示している。Kugaら（1989）、Hanazonoら（1990）およびOkabeら（1990）は、生物学的特性が増強されたさらなるG-CSF突然変異タンパク質について記述している。ElliotおよびByrne（1995）は、生物活性が増強されたEPOの突然変異型について記述している。

【0038】

Ig融合タンパク質を生産および精製する方法も提供される。そのような方法は、IL-10ではない増殖因子またはサイトカインとIgドメインとをコードする少なくとも1つの核酸で形質転換または形質移入した宿主細胞を得ることにより一般に遂行される。宿主細胞は所望の融合タンパク質が発現されるまで培養され、その後、Ig融合タンパク質は当該技術分野において周知の任意の手段によって、または以下に実施例の箇所の説明するように、精製または単離される。1実施形態では、融合タンパク質を精製する方法は、組換えにより生成されたIg融合タンパク質を含む組成物を得る工程と、カラムクロマトグラフィー法（例えば所望の分子量カットオフを備えたサイジングカラム）を使用して様々な混在物質から所望のIg融合タンパク質を分離する工程とから成る。宿主細胞は、細菌細胞、昆虫細胞または哺乳類細胞を含めるがそれらに限定されない当業者に周知のいかなる適切な原核または真核細胞系であってもよい。特に有用な細胞は哺乳

乳類細胞であり、好ましくは真核細胞であり、より好ましくはC O SまたはC H O細胞である。

【0039】

本発明の方法によって生産されたI g融合タンパク質は、種々のインビトロまたはインビボの用途に使用することができる。本発明のタンパク質は、それらの野生型、天然型、または以前から知られていた修飾相当物に関する既知の研究、診断、または治療目的に使用することができる。

【0040】

インビトロの用途には、例えば、他のタンパク質をスクリーニング、検出、および／または精製するためのタンパク質の使用が含まれる。本明細書に説明したI g融合タンパク質は、E P O、G - C S F、およびG H、G M - C S F、I L - 1 1、T P O、S C F、F l t 3リガンド、ならびに α 、 β および γ -インターフェロンに対する受容体を発現している細胞を同定するための診断薬としても有用である。I g融合タンパク質は、細胞増殖と分化を研究するためのインビトロ試薬としても有用である。

【0041】

本明細書に説明したI g融合タンパク質は、非融合タンパク質と同様に、人の同じ症状を治療するために使用することができる。例えば、E P O - I g G融合タンパク質は、腎不全、化学療法、放射線と薬物の合併症に起因する貧血を治療するために使用することができる。さらにE P O - I g G融合タンパク質は、外科手術に先立ち自身の赤血球数かヘマトクリット値を増強したい正常な個体において、赤血球の形成を刺激するために使用することができる。G - C S F - I g G融合タンパク質は、化学療法、放射線と薬物による合併症に起因する好中球減少症の治療のために、末梢血前駆細胞移植物の収集用前駆細胞の動態化のために、および重篤な慢性好中球減少症の治療のために、使用することができる。G H - I g G融合タンパク質は、低身長および悪液質を治療するために使用することができる。I F N - α - I g G融合タンパク質はウィルス疾病と癌を治療するために使用することができる。I F N - β - I g G融合タンパク質は、多発性硬化症、ウィルス疾患および癌を治療するために使用することができる。G M - C S

F-I g G融合タンパク質は、化学療法、放射線と薬物による合併症に起因する好中球減少症の治療のために、末梢血前駆細胞移植物の収集用前駆細胞の動態化のために、および重篤な慢性好中球減少症の治療のために、および癌ワクチン用のアジュバントとして、使用することができる。SCF-I g GおよびFlt3リガンド-I g G融合タンパク質は、末梢血前駆細胞移植物の収集用に造血前駆細胞を動態化するために使用することができる。IL-11-I g GおよびTPO-I g G融合タンパク質は、血小板減少症の治療のために使用することができる。

【0042】

本明細書に記述したI g G融合タンパク質は、患者の中でより長い循環半減期を有するだろう。これにより融合タンパク質は、非融合タンパク質よりも少ない回数および/またはより低い有効用量で投与される。通常、GHおよびG-CSFは毎日の注射で投与され、EPOは週に3回の注射で投与される。当業者は適切な用量、回数、および経路を容易に決定することができる。そのような決定を行う際に関わる要因としては、投与するタンパク質の性質および非活性、治療すべき症状、患者の服薬率、患者の年齢および体重、ならびにその同等のものが挙げられる。本発明の化合物は、取り付けられる治療用物質の循環半減期の増強用または体内の特定のターゲットへの送達用の伝達媒体としても使用することができる。

【0043】

薬学的に許容可能な担体に本発明のI g G融合タンパク質を含有させた医薬組成物も提供される。当業者は、生理食塩水、Ringer液、およびその同等物を含むがそれらに限定されないそのような薬学的に許容可能な担体を容易に認識することができる。薬物、試薬、治療用薬剤を始めとする他の物質も医薬組成物に含有させることができる。

【0044】

本発明のI g G融合タンパク質を構成する詳細な方法を、以下の実施例において説明する。実施例は、本発明を限定するのではなく例証を意図したものである。

(実施例1)

増殖因子／サイトカイン—IgG遺伝子融合体の構築

A. 一般的戦略

増殖因子／サイトカイン (GF) - IgG 遺伝子融合体を、下記のように構築した。これらの構築に利用した一般的戦略をここに概説し、各クローニングステップの特性を以下に詳述する。一般的戦略への追加的な変形例 (variation) に関与する IgG 4-C_H コード配列のクローニング、及びこれらの変形例を、以下の記載する。ヒト増殖因子遺伝子 (GH、EPO、及びG-CSF) を、以下に詳述する種々のRNA源からcDNAとしてクローニングした。これらのクローニングに用いたPCRプライマーは、最も効果的なコザック配列 (GCCACC; Kozak, 1991) 及びHind III制限部位を、これらのクローンそれぞれの5'末端に付加させ、Bam HI制限部位で終結するペプチドリンカーの一部 (ser-gly-gly-ser) (配列番号1) を、これらのクローンそれぞれの3'末端に付加させた。その増殖因子遺伝子を、Hind III-Bam HI断片として哺乳類細胞発現ベクターpCDNA3.1 (+) (インビトロゲン社、カリフォルニア州サンディエゴ所在 (Invitrogen, Inc., San Diego, CA)) にクローニングし、塩基配列決定をした。同時に、IgGコード配列 (IgG1-Fc、IgG1-C_H、IgG4-Fc、IgG4-C_H) を、ヒト白血球RNAから生成したcDNAからクローニングした。これらのクローニングに用いたPCR順方向プライマーは、これらのクローンそれぞれの5'末端にBam HI制限部位を含有するペプチドリンカーの一部 (gly-ser-gly-gly-ser) (配列番号2) を組み込んだ。逆方向PCRプライマーは、IgG1及びIgG4 mRNAの3'非翻訳領域 (翻訳終止コドンの約40bp下流) にアニーリングするよう設計しており、Xba I制限部位を含んでいた。IgGコード配列を、Bam HI-Xba I断片としてpCDNA3.1 (+) に入れてクローニングして、DNA塩基配列決定法で確認した。その後、IgGコード配列をBam HI-Xba I断片として切り出すことにより融合遺伝子を構築し、Bam HI及びXba Iで切断したpCDNA::GF組換えプラスミドに、これらの断片を入れてクローニングした。得られたpCDNA3.1構造体の中で、ク

ローニングした融合遺伝子の上流のpCDNA3.1(+)に存在する強力なサイトメガロウイルス即時プロモータにより、融合遺伝子を転写する。リンカー配列内のBam HI部位を通した2つの断片のライゲーションにより、融合接続部に7つのアミノ酸リンカー (ser-gly-gly-ser-gly-gly-ser) (配列番号3) がもたらされる。

【0045】

B. 成長ホルモン、EPO及びG-CSFのクローニング

1. ヒト成長ホルモンのクローニング

ヒト成長ホルモン (GH) をコード化するcDNAを、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術及びプライマーBB87 (5'>GCAAGCTTGCCACCATGGCTACAGGCTCCCGGACG 3') (配列番号4) 及びBB88 (5'>CGCGGATCCTCCGGAGAA GCCACAGCTGCCCTCCAC>3') (配列番号5) を用いて、ヒト下垂体一本鎖cDNA (クロンテック社、カリフォルニア州パロアルト所在 (CLONTECH, Inc., Palo Alto, CA)) から増幅させた。プライマーBB87は、hGH分泌シグナルのためのコード配列の5'末端にアニーリングするが、逆方向プライマーBB88は、GHコード配列の3'末端にアニーリングする。得られた~680bpのPCR産物を、Hind III及びBam HIで消化し、ゲル精製して、Hind III及びBam HIで消化しアルカリホスファターゼ処理してゲル精製したpCDNA3.1(+)ベクター (インビトロゲン社、カリフォルニア州カルズバッド (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA)) に入れてクローニングした。正しいDNA配列を備えたクローン (Martialら、1979; Roskam及びRougeon、1979; Seeburg、1982; DeNotoら、1981) を、pCDNA3.1(+) : : GHfus又はpBBT159と称した。

【0046】

2. ヒトエリスロポエチンのクローニング

ヒトエリスロポエチン (EPO) をコード化するcDNAを、順方向プライマー-BB45 (5'>CCCGGATCCATGGGGGTGCACGAATGTC

CTG>3) (配列番号6) 及び逆方向プライマーBB47 (5>CCCGAA TTCTATGCCCAGGT GGACACACCTG>3) (配列番号7) を用いたPCRによりクローニングした。BB45は、EPOシグナル配列の開始メチオニン及びアミノ末端部分をコード化するDNA配列にアニーリングし、クローニング目的でBam HI 部位を含有する。BB47は、翻訳終止シグナル直後のEPO mRNAの3' 非翻訳領域にアニーリングし、クローニング目的でEco RI 制限部位を含有する。ヒト肝細胞系Hep3Bから単離した全体RNAを、PCRのための一本鎖cDNAの第一鎖合成に用いた。細胞全体RNAの調製のために、Hep3B細胞 (アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (メリーランド州ロックビル所在) (American Type Culture Collection, Rockville, MD) から入手) を、10%ウシ胎児血清 (FBS) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で増殖させた。EPO発現は、細胞を130 μ Mデフェロキサミン又は100 μ M塩化コバルトで18時間処理することにより誘導した (Wang 及び Semenza, 1993)。RNeasy Miniキット (キアゲン社、カリフォルニア州サンタクラリタ所在 (Qiagen, Santa Clarita, CA)) を用い、メーカーの説明書に従って、RNAを細胞から単離した。RNA総量約320 μ gを、塩化コバルトで処理した細胞1.4 $\times 10^7$ 個から単離し、RNA総量270 μ gを、デフェロキサミンで処理した細胞1.4 $\times 10^7$ 個から単離した。

【0047】

一本鎖cDNAの第一鎖合成を、ベーリンガーマンハイム社 (インディアナ州インディアナポリス所在) (Boehringer Mannheim Corporation (Indianapolis, IN)) の1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) を用いて実行し、ランダムヘキサマーをプライマーとして用いた。第一鎖合成の産物を用いた次のPCR反応は、プライマーBB45及びBB47を用いて実施した。反応産物をアガロースゲルで泳動すると、予測された~600bpのPCR産物が観察された。RNA調製物は、どちらもEPO PCR産物を生成した

。PCR産物を、Bam HI及びEco RIで消化して、Bam HI及びEco RIで切断しアルカリホスファターゼで処理したベクターpUC19に入れてクローニングした。DNA塩基配列決定法により、EPO遺伝子の正しいコード配列を含有するクローンを同定した。このプラスミドを、pBBT131と称した。

【0048】

プラスミドpBBT131を、プライマーBB89 (5'CGCAAGCTTGCACCATGGGGGTGCACGAATGTCCT>3) (配列番号8) 及びBB90 (5'CGCGGATCCTCCGGATCTGTCCCTGTCTCTGCAGGC>3) (配列番号9) を用いたPCR反応で鋳型として用い、IgG遺伝子との融合に適した修飾EPO cDNAを構築した。プライマーBB89は、EPO分泌シグナルのためのコード配列の5'末端にアニーリングし、逆方向プライマーBB90は、EPOコード配列の3'末端にアニーリングする。得られた~610bpのPCR産物を、Hind III及びBam HIで消化し、ゲル精製して、Hind III及びBam HIで消化しアルカリホスファターゼ処理してゲル精製したpCDNA3.1 (+) ベクターにクローニングした。正しいDNA配列を備えたクローン (Linら、1985) を、pCDNA3.1 (+) : : EPOfus又はpBBT176と称した。

【0049】

同様の手順を用いると、Arg 166が欠失した改変EPO cDNAを作製することができる。この場合、その配列 (5'CGCGGATCCTCCGGATCTGTCCCCTGTCTCTGCAGGCCTC>3) (配列番号10) を備えたプライマーを、プライマーBB90の代わりに用いることができる。

【0050】

3. ヒト顆粒球コロニー刺激因子のクローニング

ヒト顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) をコード化するcDNAを、ヒト膀胱癌 (bladder carcinoma) 細胞系5637 (アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (メリーランド州ロックビル所在) (American Type Culture Collection, Rockville, MD

から入手) から単離した全体RNAから、PCRにより増幅させた。その細胞を、10% FBS、50単位/ml ペニシリン、及び50 μ g/ml ストレプトマイシンを添加したRoswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640培地で増殖させた。RNAを、キアゲン社(カリフォルニア州サンタクラリタ所在 (Qiagen Inc. (Santa Clarita, CA)) から購入したRNeasy Mini RNA単離キットを用い、メーカーの説明書に従って、細胞から単離した。RNA総量~560 μ gを、 4.5×10^7 個の細胞から単離した。一本鎖cDNAの第一鎖合成を、ペーリンガーマンハイム社(インディアナ州インディアナポリス所在) (Boehringer Mannheim Corp (Indianapolis, IN)) の1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) を用いて実行し、ランダムヘキサマーをプライマーとして用いた。第一鎖合成の産物を用いた次のPCR反応は、順方向プライマーBB91 (5>CGCAAGCTTGCCACCATGGCTGGACCTGCCACCCAG>3) (配列番号11) 及び逆方向プライマーBB92 (5>CGCGGATCCTCCGGAGGGCTGGGCAAGGTGGCGTAG>3) (配列番号12) を用いて実施した。プライマーBB91は、G-CSF分泌シグナルのためのコード配列の5'末端にアニーリングし、逆方向プライマーBB92は、G-CSFコード配列の3'末端にアニーリングする。得られた~640bpのPCR産物を、Hind III及びBam HIで消化し、ゲル精製して、Hind III及びBam HIで消化しアルカリホスファターゼ処理してゲル精製したpCDNA3.1 (+) ベクターに入れてクローニングした。正しいDNA配列を備えたクローン (Souzaら、1986; Nagataら、1986a、b) を、pCDNA3.1 (+) : G-CSF fus又はpBBT165と称した。

【0051】

C. IgGコード配列のクローニング

1. IgG1-Fcコード配列のクローニング

IgG1-Fc (ヒンジ-CH2-CH3ドメイン) をコード化するcDNA

を、プライマーBB83 (5' > CGCGGATCCG GTGGCTCAGAG CCCAAATCTTGTGACAAAAC T > 3') (配列番号13) 及びBB82 (5' > CGCTCTAG AGGTACGTGCCAAGCATCCTCG > 3') (配列番号14) を用いたPCRにより、ヒト白血球一本鎖cDNA (クロンテック社、カリフォルニア州パロアルト所在 (CLONTECH, Inc., Palo Alto, CA)) から増幅させた。順方向プライマーBB83は、IgG1のヒンジドメインのコード配列の5' 末端にアニーリングするが、逆方向プライマーBB82は、翻訳終止コドンの約45bp下流のIgG1及びIgG4 mRNAの3' 非翻訳領域にアニーリングする。IgG1及びIgG4配列は、BB82がアニーリングする21bpセグメントにわたり同一であった。約790bpのPCR産物を、Bam HI及びXba Iで消化し、ゲル精製して、Bam HI及びXba Iで消化しアルカリホスファターゼ処理してゲル精製したpCDNA3.1 (+) ベクターにクローニングした。2つのクローンを塩基配列決定したが、それぞれはアミノ酸置換変異をもたらす単一塩基置換を含有した。他の点では、その配列は、発表されたヒトIgG1ゲノムDNA配列 (Ellisonら、1982) とマッチした。我々は、2つのクローンの突然変異の相対的位置により、インビトロ組換えを通してpCDNA3.1 (+) の全長IgG1-Fcクローンを構築するための、簡便で固有の制限部位 (pCDNA3.1 (+) ベクターのIgG1及びBg1 IIのCH2ドメインのSac II) を用いることができた。得られたクローンは、正しいIgG1-Fc配列を有し、pCDNA3.1 (+) : : fus IgG1-Fc又はpBB167と称した。

【0052】

2. IgG4-Fcコード配列のクローニング

IgG4-Fc (ヒンジ-CH2-CH3ドメイン) をコード化するcDNAを、プライマーBB84 (5' > CGCGGATCCGG GTGGCTCAGAG TCCAAATATGGTCCCCCATGC > 3') (配列番号15) 及びGG82 (5' > CGCTCTAG AGGTACGTGCCAAGCA TCCTCG > 3') (配列番号14) を用いたPCRにより、ヒト白血球一本鎖cDNA (

クロンテック社 (CLONTECH) から増幅させた。順方向プライマーBB84は、IgG4のヒンジドメインのコード配列の5'末端にアニーリングする。逆方向プライマーBB82は、上に記載している。～790bpのPCR産物を、BamHI及びXbaIで消化し、同様に消化したpCDNA3.1(+)に入れてクローニングした。正しいcDNA配列を備えたクローン (Elliersonら、1981) を、pCDNA3.1(+) : f us IgG4-Fc又はpBB158と称した。

【0053】

3. IgG1-C_H コード配列のクローニング

IgG1-C_H (CH1-ヒンジ-CH2-CH3ドメイン) をコード化するcDNAを、BB81 (5' > CGCGGATCC GGTGGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATC > 3') (配列番号16) 及びBB82 (5' > CGCTCTAGAGGTACGTGCCAAGC ATCCTCG > 3') (配列番号14) を用いたPCRにより、ヒト白血球一本鎖cDNA (クロンテック社 (CLONTECH)) から増幅させた。順方向プライマーBB81は、IgG1及びIgG4のCH1ドメインのコード配列の5'末端にアニーリングする。これら2つのエキソンのCH1ドメインの5'末端の配列は、ほとんど同一である (20個のヌクレオチド中19個がマッチする)。逆方向プライマーBB82は、上に記載している。～1080bpのPCR産物を、BamHI及びXbaIで消化し、ゲル精製して、同様に消化したpCDNA3.1(+)に入れてクローニングした。原則として、これらのプライマーは、IgG1及びIgG4配列の両者とも増幅させることができる。IgG1は、IgG4よりも血清中にかなり豊富にあるため (Roittら、1989)、我々はほとんどのクローンはIgG1をコード化すると予測した。塩基配列決定した最初の2つのクローンは、IgG1であったが、それぞれがアミノ酸置換変異をもたらした単一塩基置換を含有した。他の点では、得られた配列は、発表されたヒトIgG1ゲノムDNA配列 (Elliersonら、1982) とマッチした。我々は、2つのクローンの突然変異の相対的位置により、インビトロ組換えを通してpCDNA3.1(+)の全長IgG1-C_H クローンを構築するための、簡便で固有の制

限部位 (pCDNA3. 1 (+) ベクターの IgG1 及び Bst B1 の CH1 ドメインの Age I) を用いることができた。正しい IgG1-CH 配列を備えたクローンは、pCDNA3. 1 (+) : : fus IgG1-CH 又は pBB T166 と称した。

【0054】

4. IgG4-CH コード配列のクローニング

IgG1 及び IgG CH1 ドメインの 5' 末端をコード化する DNA 配列がほとんど同一であること、及び IgG4 mRNA が相対的に少ないことにより、IgG4-CH コード配列をクローニングするための別の戦略が導かれた。PCR を基にした部位特異的突然変異誘発を用いて、クローニングした IgG1 CH1 ドメインの DNA 配列を変化させ、IgG4 CH1 ドメインのアミノ酸配列にマッチさせた。CH1 ドメインは、アミノ酸が 98 個中 8 個しか異なっており、これらの位置が集中しているため、2 つの突然変異誘発性オリゴ (mutagenic oligos) を用いた 1 サイクルの PCR により、IgG1 CH1 配列を IgG4 CH1 配列に変換することができる。2 サイクル目の PCR は、Bam HI 部位及びリンカー配列を IgG4 CH1 の 5' 末端に付加させ、IgG4 ヒンジドメインからの 21 bp の配列を 3' 末端に付加させた。その後、「重複伸長による遺伝子スプライシング」の技術 (Horton ら、1993; Innis ら、1990) を利用して、人工的に作製した IgG4 CH1 ドメインを IgG4 Fc (ヒンジ-CH2-CH3) 配列で組換えた。この技術では、同一配列のセグメントを共有する 2 つの別個の断片 (一端が「重複」) を、図 1 に示すように PCR 反応でアニーリングした重複領域を通して伸長させる。

【0055】

IgG4 CH1 配列を構築するために、突然変異誘発性プライマー BB119 (5'>TCCACCAAGGGCCCATCCGT CTCCCCCTGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCC>3) (配列番号 17) 及び BB120 (5'>TCTCTTGTCACCTTG GTGTTGCTGGGCTTGTGATC TACGTTGCAGGTGTA GGTCTTCGTGCCCAA>3) (配列番号 18) を、上記のようにクロ

ーニングしたIgG1-C_H 配列を保有するpBB166と共にPCR反応に用いた。順方向プライマーBB119は、CH1ドメインのアミノ酸23個中2個をコード化する配列にアニーリングし、4つのアミノ酸置換物(S14C、K16R、G20E、及びG21S)をコード化する。逆方向プライマーBB120は、CH1ドメインのアミノ酸97個中76個をコード化する配列にアニーリングし、別の4つのアミノ酸置換物(Q79K、I82T、N86D、及びK97R)をコード化する。～290bpのこのPCR反応の産物をゲル精製し、プライマーBB81(上記実施例1のC3を参照)及びBB121(5'TGGGGGACCATATTTGGACTCAACTCTCTTGTCCACCTT>3)(配列番号19)と共に、PCR反応で鋳型として用いた。逆方向プライマーBB121は、IgG4のCH1ドメインの3'末端にアニーリングし、CH1ドメインの98位アミノ酸及びIgG4のヒンジドメインに伸長する21bpを付加する。～330bpのこの反応の産物をゲル精製して、PCRスプライシング反応の鋳型分子の1つとして用いた。スプライシング反応のための別の鋳型を、上記のようにIgG4Fcドメインを増幅させるプライマーBB84及びBB82による、pBBT158(前の実施例1のC2に記載)のクローニングIgG4-Fc配列のPCRで生成した。得られた～790bpの産物は、IgG4ヒンジ-CH2-CH3配列から構成されている。この断片をゲル精製して、PCRスプライシング反応での鋳型分子の1つとして用いた。この反応は、プライマーBB81及びBB82を利用し、～1075bpの全長「スプライシング」産物を生成した。この産物を確認するために必要なDNA塩基配列決定を最小限にするために、PCR断片をBamHI及びSacIIで消化して、～530bpの断片(完全なCH1及びヒンジドメインと、CH2ドメインの一部とを含有する)を、塩基配列決定のためにpBC-SK+(ストラタジーン社(Stratagene))にクローニングした。BamHI-SacII断片の配列を、「pBBT182」という名称の1つのクローンで確認した。その後、以下に記載のように、pBBT182のBamHI-SacII断片を用いて、GF-IgG4-Fcクローンを全長GF-IgG4-C_Hクローンに変換した。

【0056】

D. 成長ホルモン、EPO、及びG-CSF-IgG融合体の構築

EPO、G-CSF、及びGH-IgG遺伝子融合体のほとんど(12個中9個)は、pCDNA3.1(+)中でクローニングしたIgGコード配列をBamHI-XbaI断片として切り出し、BamHI及びXbaIで切断したpCDNA::[GF]組換えプラスミドにこれらの断片をクローニングすることにより生成した。IgG4-C_Hへの3種の増殖因子遺伝子の融合体は、pBBT182の~530bpのBamHI-SacI断片を切り出して、3種のpCDNA::[GF]-IgG4-Fcクローンの~240bpのBamHI-SacI断片を、この~530bpのBamHI-SacI断片に置換することにより構築した。得られたプラスミド及びそれらがコード化したGF-IgG融合タンパク質は、表1に列挙している。

【0057】

E. G-CSF(C17S)-IgG融合タンパク質

G-CSFのシステイン17をセリンで置換しているG-CSF-IgG融合体[G-CSF(C17S)]を、以下の2つのオリゴヌクレオチドプライマー:C17S-F(5' TTCCTGCTCAAGTCCCTTAGAGCAAGTG-3') (配列番号20)及びC17S-R(5' CACTTGCTCTAAGGACTTGAGCAGGAA-3') (配列番号21)を用いたPCR突然変異誘発により構築することができる。例えば、G-CSF(C17S)-IgG1-Fc融合体は、pBBT174を鋳型として用いた2種の別個のPCR反応を実施することにより構築することができる。1つの反応は、オリゴC17S-FをBB82と共に用いることができる。2番目のPCR反応は、オリゴC17S-RをBB91と共に用いることができる。これらの反応のPCR産物を、ゲル精製し、混合して、BB82及びBB91を用いて再増幅させることができる。~1300bpの産物を、HindIII及びPflMIで消化し、HindIII/PflMIバンドをゲル精製して、同様に切断したプラスミドpBBT174にクローニングすることができる。E. Coli DH5αの形質転換の後、C17S突然変異を含有するプラスミドクローンを、DNA塩基配列決定

法により同定することができる。同様の突然変異誘発手順を用いて、適当なヌクレオチド（所望のアミノ酸をコード化するセンス及びアンチセンスヌクレオチド）を、オリゴC17S-F及びC17S-Rの下線のヌクレオチドに置換することにより、システイン-17を別のアミノ酸に変化させることができる。

【0058】

（実施例2）

GF-IgG融合タンパク質の発現及び精製

A. COS細胞の少量（small scale）形質移入

GF-IgG融合タンパク質の発現及び生物活性を、最初はCOS細胞の少量形質移入により評価した。エンドトキシンを含まないプラスミドDNAを、「Endo-Free Plasmid Purification Kit」（キアゲン社（Qiagen Inc.））を用い、販売業者のプロトコールに従い調製して、COS-1細胞（アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（メリーランド州ロックビル所在）（American Type Culture Collection, Rockville, MD）から入手）をトランスフェクトするために用いた。COS-1細胞は、10%FBS、50単位/mlペニシリン、50 μ g/mlストレプトマイシン、及び2mMグルタミンを添加したダルベッコ改変イーグル培地（COS細胞増殖培地）で増殖させた。最初の形質移入実験は、以下のプロトコールを用いて、Costar 6穴組織培養プレート（VWRサイエンティフィック社（VWR Scientific））で実施した。要約すると、2 \sim 3 \times 10⁵細胞をCOS細胞増殖培地2mlの各ウェルに播種して、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で一夜インキュベートさせると、その時までに細胞は50 \sim 60%集密に達した。各ウェル毎に、プラスミドDNA 0.8 μ gを、OPTI-MEM1 Reduced Serum Medium（ギブコBRL社 メリーランド州ゲイザーズバーグ所在（Gibco BRL, Gaithersburg, MD））186 μ l中のLipofectAMINE試薬（ギブコBRL社 メリーランド州ゲイザーズバーグ所在（Gibco BRL, Gaithersburg, MD））6 μ lと、室温で30 \sim 45分間複合させた。COS-1細胞を、OPTI-MEM1 2ml/ウェ

ルで1回洗浄し、その後OPTI-MEM 1. 8 mlを各ウェルに添加した。その後、複合体混合物をウェルに添加して、37℃、5%CO₂で約4~5時間放置した。インキュベーション期間の後、混合物をCOS細胞増殖培地2 ml /ウェルに置換して、37℃、5%CO₂で一晩放置した。翌日、細胞をDME M (添加剤なし) 2 ml /ウェルで2回洗浄した。洗浄ステップの後、無血清COS細胞増殖培地2 mlを各ウェルに添加して、細胞を37℃、5%CO₂で放置した。GF-IgG融合タンパク質を含有する馴化培地を、72時間後に採取して、SDS-PAGE及びウェスタンブロットで分析して、GF-IgG融合タンパク質の発現を確認した。その親プラスミドpCDNA3. 1 (+) (インビトロゲン社 (Invitrogen)) を、陰性対照として用いた。形質移入効率は、E. Coliのβ-ガラクトシダーゼを発現するpCMVβ (クロンテック社 (Clontech)) を用いて、約15%であると推定された。β-ガラクトシダーゼを発現する形質移入細胞は、β-Gal Staining Set (ペーリンガー・マンハイム社、インディアナ州インディアナポリス所在 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)) を用いて同定した。

【0059】

(所望なら1%β-メルカプトエタノール (BME) を添加したSDS-PAGE試料緩衝液で馴化培地の試料を調製して、) プレキャストの14%トリスグリシンボリアクリルアミドゲル (ノベックス社 (Novex)) で電気泳動した。適当な抗血清を用いたウェスタンブロットにより、GF-IgG融合タンパク質全ての発現が実証された。GH-IgG融合タンパク質は、ポリクローナルウサギ抗合成hGH抗血清 (Dr. A. F. Parlow及びナショナル・ホルモン・アンド・ピチューイタリー・プログラム (National Hormone and Pituitary Program) から贈呈された) を用いて検出した。EPO-及びG-CSF-IgG融合タンパク質は、R&Dシステムズ社 (ミネソタ州ミネアポリス所在) (R&D Systems (Minneapolis, MN)) から購入したポリクローナル抗血清を用いて検出した。馴化培地の連続希釈液を、後記の適当なインビトロバイオアッセイで分析

した。これらのアッセイにより、馴化培地での有意な活性が実証された。

【0060】

B. COS-1細胞の大量形質移入

大量形質移入を、100mm組織培養皿又はCorning T-75組織培養フラスコ（VWRサイエンティフィック社（VWR Scientific））を用いて実施した。100mm皿では、 1.6×10^7 個の細胞を、COS細胞増殖培地10ml/皿に入れて、37℃、5%CO₂ で一夜インキュベートした。各100mm皿に、エンドトキシンを含まないプラスミドDNA 6.7μg、OPTI-MEM1 1.5ml中のLipofectAMINE試薬50μlと、室温で30～45分間複合させた。COS-1細胞をOPTI-MEM1 10ml/皿で1回洗浄し、その後OPTI-MEM1 6.6mlに置換した。複合体形成の後、複合体1.67mlを各皿に添加して、37℃、5%CO₂ で4～5時間放置した。インキュベーション期間の後、反応混合物を血清含有COS細胞増殖培地10ml/皿に置換して、37℃、5%CO₂ で一夜放置した。翌日、細胞をDMEM（添加剤なし）10ml/皿で2回洗浄した。洗浄ステップの後、無血清COS細胞増殖培地10mlを各皿に添加して、37℃、5%CO₂ でインキュベートした。馴化培地を、3日毎に（3、6、9、及び12日目）日常的に採取して、新鮮な無血清COS細胞増殖培地を細胞に添加した。T-75培養フラスコでの形質移入は、以下の例外を除けば100ml皿でのプロトコールと同等であった。（各T-75フラスコでは、 2×10^6 個/フラスコの細胞を入れ、エンドトキシンを含まないプラスミドDNA 9.35μgを、OPTI-MEM1 2.1ml中のLipofectAMINE試薬70μlと複合させた。複合体形成の後、複合体2.3mlをOPTI-MEM1 7.7mlを含有する各フラスコに添加した。）形質移入効率は、pCMVβを用い、前記のβ-ガラクトシダーゼ発現を染色することより、約15%と測定された。表1に列挙した12種のプラスミドを、大量形態で用いるCOS-1細胞にトランスフェクトして、精製のためにタンパク質を生成させた。馴化培地を、遠心分離で不純物除去して、後の精製のために-80℃で保存した。ウェスタンブロットを用いて、IgG-融合タンパク質の発現を確認した。

【0061】

C. GF-IgG-融合タンパク質の精製

各IgG-融合タンパク質毎に形質移入COS-1細胞の馴化培地約300mlをプールして、Ultrafiltration細胞と、YM3又はYM30DIAFLO Ultrafiltration膜（アミコン社 マサチューセッツ州ベヴァリー所在（Amicon, Beverly, MA））のいずれかを用いて濃縮した。その後、濃縮したプールを、20mMリン酸ナトリウム（pH7.0）で予め平衡にした1ml Pharmacia HiTrap recombinant Protein Aカラムに負荷した。A₂₈₀がベースラインに達するまで、カラムを20mMリン酸ナトリウムで洗浄した。結合したタンパク質を、100mMクエン酸ナトリウム（pH3.0）で溶出して、十分な1Mトリス（pH9.0）中に回収して、最終的pHを約7.0にした。各融合タンパク質を専用のカラムを用いて精製し、交叉汚染の可能性を回避した。IgG融合タンパク質全てを同様にクロマトグラフィーにかけ、溶出ステップで単一ピークを生成させた。カラム分画を、8~16%プレキャストトリスグリシンSDS-PAGEを用いて分析し、IgG-融合タンパク質が豊富な分画をプールした。標準としてウシ血清アルブミン（BSA）を用いて、プールした分画のタンパク質濃度を、Bradfordアッセイ（バイオラッド・ラボラトリーズ社（カルフォルニア州リッチモンド所在）Bio-Rad Laboratories（Richmond, CA））で測定した。

【0062】

精製したGF-IgG融合タンパク質を、還元及び非還元条件下、SDS-PAGEで分析して、クマシーブルーで染色した。GF-IgG融合タンパク質は全て、主に二硫化物結合二量体として回収した（典型的には、回収されたIgG融合タンパク質の90%を超える量が二量体であった）。タンパク質の見かけ上の分子量は、非還元条件下では115~190kDa（二硫化物結合二量体）、還元条件下では50~75kDa（単量体）の範囲であり、表1で予測した分子量と大きく一致した。単量体と二量体のサイズの差により、単量体と二量体をSDS-PAGEで容易に識別することができた。単量体及び二量体GH-IgG-

Fc融合タンパク質の見かけ上の分子量は、それぞれ約50kDa及び115kDaであった。単量体及び二量体G-CSF-IgG-Fc融合タンパク質の見かけ上の分子量も、それぞれ約50kDa及び115kDaであった。二量体IgG-C_H融合体の見かけ上の分子量は、予測よりも大きかった(GH-IgG-C_H及びG-CSF-IgG-C_H融合体では約160kDa、EPO-IgG-C_H融合体では約180kDa)。EPO-IgG-C_H融合単量体も、予測よりも大きく、約74kDaの見かけ上の分子量を保有した。EPO-IgG-Fc融合タンパク質の分子量も、予測よりも大きかった(見かけ上の単量体及び二量体分子量はそれぞれ62kDa及び130kDa)。EPO-Ig融合タンパク質が予測サイズよりも大きいのは、おそらくEPOドメインの広範なグリコシル化によるものであろう。単量体融合タンパク質は、精製したタンパク質全てに存在したが、IgG4融合タンパク質の方が豊富であった。主要なIgG融合タンパク質バンドのサイズは、ウシIgGの分子量とは異っており、精製したタンパク質に実験で用いた血清のウシIgGが混入していないことが示された。主要なIgG融合タンパク質バンドは、試料のウェスタンブロットではGH、EPO、及びG-CSFに特異的な抗血清とも反応した。ゲルのクマシーブルー染色から、IgG融合タンパク質の精製が少なくとも90%であると推定された。

【0063】

試料を非還元条件下で分析した場合には、GF-IgG-C_H融合体全てが、ゲル上部に移動する大きな凝集体を含有した。試料を還元条件下で分析した場合には、この凝集体は消失し、主要なGF-IgG-C_Hバンドの分子量のタンパク質量が、比例して増加するように思われた。その凝集体は、種々の増殖因子に特異的な抗血清とも反応した。これらのデータから、凝集体がGF-IgG-C_H融合タンパク質の二硫化物結合多量体であることが示唆される。縮小したSDS-PAGE条件下では、GF-IgG-C_H融合体全てが、主なGF-IgG-C_Hバンドよりも約20kDa大きな、広がったバンドを示している。このバンドは、増殖因子に対する抗血清と反応し、その凝集体に関係する可能性がある。

【0064】

【表1】

表1 GF-IgG融合タンパク質の予想分子量と回収

発現プラスミド	IgG融合タンパク質	予想分子量(kDa)	
		単量体	二量体
PBBT 171	GH-IgG1-C _H	58,706	117,412
PBBT 172	GH-IgG1-Fe	48,693	97,386
PBBT 183	GH-IgG4-C _H	58,541	117,082
PBBT 163	GH-IgG4-Fe	48,365	96,730
PBBT 173	G-CSF-IgG1-C _H	55,564	111,128
PBBT 174	G-CSF-IgG1-Fe	45,551	91,102
PBBT 184	G-CSF-IgG4-C _H	55,399	110,798
PBBT 175	G-CSF-IgG4-Fe	45,222	90,444
PBBT 179	EPO-IgG1-C _H	54,972	109,944
PBBT 180	EPO-IgG1-Fe	44,960	89,920
PBBT 185	EPO-IgG4-C _H	54,808	109,616
PBBT 181	EPO-IgG4-Fe	44,632	89,264

1 グリコシル化による分子量の寄与は含まない

(実施例3)

精製GF-IgG融合タンパク質のインビトロ生物活性

A. 一般的戦略

IgG融合タンパク質のインビトロ生物活性を測定するために細胞増殖アッセイを開発した。このアッセイでは、テトラゾリウム塩MTS [3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-3-カルボキシフェニル]-2-(4-スルフェニル)-2H-テトラゾリウム]の取り込みと生体内還元が測定される。メト硫酸フェナジン(PMS)などの電子結合体が存在すると、MTSは、組織培養培地に溶解することができ、かつ490nmで直接測定することができるホルマゼン生成物に転化される。細胞数は約2までの吸光度と直線関係にある。EPOおよびG-CSFについては、既存の細胞系を使用してバイオアッセイを開発することができた。GHでは、GHに応答して増殖する細胞系を作成する必要がある。このような細胞系を、マウス白血病細胞系をウサギGH受容体により安定に形質転換することにより作成した。

- 【0065】

一般に、バイオアッセイは、適当な細胞を培地（添加物無し）で3度洗浄し、その細胞を添加物含有培地（各細胞系に対し使用した培地は以下に示す）中に $0.7-1 \times 10^3 / \text{ml}$ の濃度で再懸濁させることにより開始される。 $50 \mu\text{l}$ ($3.5-5 \times 10^3 / \text{ml}$ 細胞) の細胞懸濁液を、平底96ウェル組織培養プレートの試験ウェル毎にアリコートに分けて入れた。試験するタンパク質サンプルの連続希釈物を血清含有培地で調製した。 $50 \mu\text{l}$ の希釈タンパク質サンプルを試験ウェルに添加し、プレートを加湿5% CO_2 組織培養インキュベータ中、 37°C でインキュベートした。タンパク質サンプルを3連のウェルで分析した。60-72時間後、 $20 \mu\text{l}$ のMTS/PMS混合物 (Cell Titer 96 Aqueous One Solution、プロメガ社、ウィスコンシン州マディソン所在 (Promega Corporation, Madison, WI)) を各ウェルに添加し、組織培養インキュベータ中 37°C で1-4時間プレートをインキュベートした。微量プレート読み取り装置を用いてウェルの吸光度を 490 nm で読み取った。対照標準ウェルは培地は含んだが細胞は含まなかった。3つの対照標準ウェルの平均吸光度値を試験ウェルに対し得られた平均値から差し引いた。最大刺激の半分に必要なタンパク質の量である EC_{50} を各サンプルに対して計算し、それを用いてタンパク質の生物活性を比較した。一貫性を維持するためにモル比計算においてはグリコシル化されていない分子量を使用した。EPO、G-CSFおよびGHに対し、グリコシル化されていない分子量はそれぞれ、18,936、18,987、22,129であると仮定した。IgG融合タンパク質に対する計算に単量体分子量を使用した。SDSゲルから推定された単量体融合タンパク質 (50-70 kDa) の分子量およびEPOに対する35 kDaおよびG-CSFに対する19.7 kDaのグリコシル化された分子量 (GHはグリコシル化されていない) を使用すると、同様の活性比が得られた。

[0066]

B. EPO-IgG融合タンパク質の生物活性

ヒトUT7/epo細胞系を、ハーバード大学医学部、マサチューセッツ州ボストン所在 (Harvard Medical School, Boston,

MA) のF. Bunn博士から入手した。この細胞系はEPOに应答して増殖し、細胞生存についてはEPOに依存する(Boisselら、1993年)。細胞を10%のFBS、50単位/mlのペニシリン、50 μ g/mlのストレプトマイシンおよび1単位/mlの組換えヒトEPO(CHO細胞発現; R&Dシステムズ(R&D Systems)が追加されたイスコブの改変ダルベッコ培地(IMDM)(Iscove's Modified Delbecco's Media)に維持した。バイオアッセイを上記手順を用いて細胞維持培地中で行った。組換えCHO細胞発現ヒトEPO(R&D Systems)の連続希釈物を同時に分析した。

【0067】

UT7/epo細胞系は、細胞数および吸光度値の用量依存的増加により証明されるように、rEPOに対し強い増殖応答を示す。rEPOが存在しないと、UT7/epo細胞の大部分が死亡し、吸光度値は0.1未満となる。市販のCHO細胞発現rEPOはバイオアッセイで約0.6ng/mlの平均EC₅₀を示した(表2)。この値はR&Dシステムズ仕様書において報告されたEC₅₀値(0.05-0.1単位/mlまたは約0.4-0.8ng/ml)と一致する。EPO-IgG1-FcおよびIgG4-Fc融合タンパク質はバイオアッセイにおいて約1.3ng/mlの同じEC₅₀を示した(表2)。モルを基準とすると、CHO細胞発現rEPOおよびEPO-IgG-Fc融合物のEC₅₀は区別できなかった(約30pM、表2)。EPO-IgG-C_H融合タンパク質は3.1ng/mlまたは60pMのEC₅₀を示し(表2)、これはEPO-IgG-Fc融合タンパク質および非融合rEPOに対する比活性の2倍の減少を示している。EPO-IgG4-C_H融合タンパク質は2.05ng/mlの平均EC₅₀を有していた。

【0068】

【表2】

表2 EPO-IgG融合タンパク質の生理活性

クローン	タンパク質	EC50範囲 (ng/ml) 1	平均EC50 mg/ml	平均EC50 pM
	RhEPO (CHO)	0.52, 0.55, 0.60	0.56	30
pBBT180	EPO-IgG1-Fc	1.1, 1.2, 1.5	1.27	28
pBBT181	EPO-IgG4-Fc	1.1, 1.2, 1.5	1.27	29
pBBT179	EPO-IgG1-C _H	2.9, 3.0, 3.5	3.13	57
pBBT185	EPO-IgG4-C _H	2.0, 2.1	2.05	37

1 個々の実験から得たデータ

C. G-CSF-IgG融合タンパク質の生物活性
 マウスNFS60細胞系をテネシー大学医学部、テネシー州メンフィス所在 (the University of Tennessee Medical School, Memphis Tennessee) のJ. Ihle博士から入手した。この細胞系はヒトまたはマウスG-CSFまたはIL-3に応答して増殖する (Weinsteinら、1986年)。細胞を10%のFBS、50単位/mlのペニシリン、50μg/mlのストレプトマイシンおよび17-170単位/mlのマウスIL-3 (R&Dシステムズ) を追加したRPMI 1640培地中で維持した。上記手順を用いて10%のFBS、50単位/mlのペニシリン、50μg/mlのストレプトマイシンを追加したRPMI 1640培地中でアッセイを行った。組換えヒトG-CSF (E. coli発現、R&Dシステムズ) の連続希釈物を同時に分析した。

【0069】

NFS60細胞系は、細胞数および吸光度値の用量依存的増加により証明されるように、rhG-CSFに対し強い増殖応答を示す。rhG-CSFはバイオアッセイで18pg/mlの平均EC₅₀を示した (表3)。この値はR&Dシステムズ仕様書において報告されたEC₅₀値 (10-30pg/ml) と一致する。G-CSF-IgG1-FcおよびG-CSF-IgG4-Fc融合タンパク質はそれぞれ、バイオアッセイにおいて38および57pg/mlの平均EC₅₀を示した (表3)。モルを基準とすると、rhG-CSFおよびG-CSF-IgG-Fc融合物のEC₅₀は類似し (約0.9pM、表3)、G-CSF-Ig

G4-Fc融合タンパク質のEC₅₀はわずかに減少した(1.25 pM)。G-CSF-IgG1-C_H融合タンパク質は182 pg/mlまたは3.2 pMの平均EC₅₀を示し(表3)、これはG-CSF-IgG1-Fc融合タンパク質および非融合rhG-CSFに対し比活性の3倍の減少を示している。G-CSF-IgG4-C_H融合タンパク質は182 pg/mlまたは3.9 pMの平均EC₅₀を示した(表3)。

【0070】

【表3】

表3

G-CSF-IgG融合 タンパク質の生物 活性 クローン	タンパク質	EC50範囲 (pg/ml)	平均EC50	
			pg/ml	pM
-	rhG-CSF	17, 18, 18	17.7	0.93
PBBT174	G-CSF-IgG1-Fc	34, 39, 42	38.3	0.84
PBBT175	G-CSF-IgG4-Fc	50, 59, 61	56.7	1.25
PBBT173	G-CSF-IgG1-C _H	160, 190, 195	182	3.2
PBBT184	G-CSF-IgG4-C _H	200, 230	215	3.9

1 個々の実験から得たデータ

D. GH-IgG融合タンパク質の生物活性

GH-R4細胞系はPCT/US98/14497およびPCT/US00/00931において説明されている。この細胞系はウサギGH受容体により安定に形質転換されるマウスFDC-P1細胞系の誘導体である。この細胞系はhGHに応答して増殖する。10%ウマ血清、50単位/mlのペニシリン、50 μg/mlのストレプトマイシン、2mMのグルタミン、400 μg/mlのG418、2-5 nMの下垂体hGHを含むRPMI 1640培地で細胞系を維持する。10%ウマ血清、50単位/mlのペニシリン、50 μg/mlのストレプトマイシン、400 μg/mlのG418を追加したRPMI培地を用いて、PCT/US98/14497およびPCT/US00/00931において説明されているようにGH-IgG融合タンパク質サンプルのアッセイを行った。上記2つの文献については参照により明細書に組み込むものとする。全てのアッセイはヒト下垂体GH標準を含んでいた。下垂体GHはGH-R4細胞の増殖を

刺激し、EC₅₀は0.75-0.85 ng/ml (0.03-0.04 nM) であり、これは文献 (Rowlinsonら、1995年) で報告されているものと同様であった。

【0071】

試験したGH-IgG融合タンパク質はすべてGH-R4細胞の増殖を刺激した(表4)。GH-IgG1-Fc融合タンパク質は最も活性が高く、7-8 ng/ml (~0.16 nM) のEC₅₀を示した。GH-IgG4-Fc融合タンパク質はIgG1融合タンパク質よりも活性が約2倍低く、平均EC₅₀は17 ng/ml (0.35 nM) であった。GH-IgG1-C_H融合タンパク質の活性が最も低く、EC₅₀は35 ng/ml (0.6 nM) であった。モルを基準とすると、融合タンパク質の生物活性は下垂体hGHに対し、4倍 (GH-IgG1-Fc)、10倍 (GH-IgG4-Fc)、17倍 (GH-IgG1-C_H) 減少した。

【0072】

【表4】

表4 GH-IgG融合タンパク質の生理活性

クローン	タンパク質	EC50範囲 (ng/ml) 1	平均EC50	
			ng/ml	nM
-	下垂体 hGH	0.75, 0.75, 0.85, 0.85	0.8	0.036
PBBT172	GH-IgG1-Fc	6.5, 7.0, 7.8, 9	7.6	0.160
PBBT163	GH-IgG4-Fc	15, 16, 18, 18	17	0.350
PBBT171	GH-IgG1-C _H	28, 32, 40, 40	35	0.600

1 個々の実験から得たデータ

(実施例4)

GF-IgG融合タンパク質におけるリンカーの排除または最小化

GFをIgGドメインに融合させる7アミノ酸リンカー [ser-gly-gly-ser-gly-gly-ser] を排除するか(直接融合) または減少させて2から4のアミノ酸としたGF-IgG融合タンパク質を、以下のように作成することができる。同様の方法を使用して、7アミノ酸より短いリンカーを作成したり、7アミノ酸より長いリンカーを作成したり、他のアミノ酸配列を含

むリンカーを作成したりことができる。以下で説明する実験では、例として Ig G-Fc、EPO、G-CSFを使用するが、他のGFまたはIgGドメイン、他のIgGサブタイプに対するドメイン、およびIgM、IgA、IgDおよびIgE抗体からのドメインに対し同様の手順を用いることができる。実施例において説明されるように、修飾された融合タンパク質を発現、精製し、インビトロバイオアッセイにおいてその比活性を決定することができる。

【0073】

1. 直接融合

実施例1で説明されているPCRに基づく「オーバーラップ延長による遺伝子スプライシング」によりリンカーの無いGF-IgG融合物を作成することができる(Hortonら、1993年)。短い5'延長部を有するIgG1-Fcコード配列からなり、ヒンジコード配列に直接融合されるEPOまたはG-CSFのコード配列の3'末端〜15bpからなる、PCR生成物を作成することができる。同時に、EPOまたはG-CSFコード配列に直接融合されるヒンジコード配列の最初の15bpからなる短い3'延長部を有するEPOまたはG-CSFコード配列からなるPCR生成物を作成することができる。増殖因子断片およびIgG1-Fc断片はPCR「ソーイング」(Hortonら、1993年)により共にスプライスすることができ、直接融合物が作成される。これらのPCR生成物は適当な制限酵素で消化することができ、融合点にわたる比較的小さなDNA断片が得られる。この断片は、配列確認およびCOS細胞発現のために、クローニングし、同様に切断されたベクターpCDN3.1(+):EPO-IgG1-FcおよびpCDN3.1(+):G-CSF-IgG1-Fcとすることが容易である。これらのより小さなDNA断片のクローニングにより、直接融合物の配列を確認するのに必要とされる配列決定が最小に抑えられる。

【0074】

1. A. EPO-IgG直接融合物

DNA鋳型としてプラスミドpBBT180を使用してPCRによりEPO-IgG1-Fc直接融合物を作成した。第1のPCRはオリゴBB198(5'-AGGACAGGGGACAGAGAGCCCAAATCTTG TGACAA

A-3') (配列番号22) およびBB82を使用した。第2のPCR反応はオリゴBB199 (5' -ACAAGATTTGGGCTCTCTGTCCCCCTGTCCTGCAGGC-3') (配列番号23) およびBB89を使用した。これらのPCR反応の生成物をゲル精製し、混合し、オリゴBB82とBB89を使用して第3のPCR反応を行った。約1300bpのPCR生成物をゲル精製し、Bsr GIおよびSac IIで消化し、子ウシ腸ホスファターゼで処理されている同様に切断されたpBBT180に入れてクローニングした。正しい挿入物を有するクローンをDNA配列決定により同定し、pBBT356と称した。

【0075】

DNA鋳型としてプラスミドpBBT181を使用してPCRによりEPO-IgG4-Fc直接融合物を作成した。1つのPCRはオリゴBB200 (5' -AGGACAGGGGACAGAGAGTCCAAATATGGTCCCCCA-3') (配列番号24) およびBB82を使用した。第2のPCR反応はオリゴBB201 (5' -ACCATATTTGGACTCTCTGTCCCCCTGTCCTGCAGGC-3') (配列番号25) およびBB89を使用した。これらのPCR反応の生成物をゲル精製し、混合し、オリゴBB82とBB89を使用して第3のPCR反応をさせた。約1300bpのPCR生成物をゲル精製し、Bsr GIおよびSac IIにより消化させ、子ウシ腸ホスファターゼで処理されている同様に切断されたpBBT181に入れてクローニングした。正しい挿入物を有するクローンをDNA配列決定により同定し、pBBT357と称した。正しいEPO配列を有するが、IgG-Fc領域に突然変位 (Phe-25がSerに変化) を有するクローンはpBBT273と称した。

【0076】

COS細胞をpBBT273で形質移入し、実施例2で説明したようにEPO-IgG4-Fc融合タンパク質を精製した。精製タンパク質は主にジスルフィド架橋二量体 (>90%) からなり、UT70/EPO細胞の増殖を刺激し、EC₅₀は2ng/mlであった。バイオアッセイを実施例3で説明したように実行した。

【0077】

EPO (des-Arg-166)-IgG1-Fc直接融合物を、BB198の代わりにオリゴヌクレオチドEPODFC (5'-TGCAGGACAGGGGACGAGCCCCAAATCTTGTGACAAA-3') (配列番号26) を使用し、BB199の代わりにEPODFE (5'-ACAAGATTTGGCTCGTCCCCTGTCCTGCAGGCCTC-3') (配列番号27) を使用することを除き、EPO-IgG1-Fc直接融合物について上述したように作成することができる。同様に、EPO (des-Arg-166)-IgG4-Fc直接融合物を、BB200の代わりにEPODFG (5'-TGCAGGACAGGGGACGAGTCCAAATATGGTCCCCCA-3') (配列番号28) を使用し、BB201の代わりにEPODFH (5'-ACCATATTTGGACTCGTCCCCTGTCCTGCAGGCCTC-3') (配列番号29) を使用することを除き、EPO-IgG4-Fc直接融合物について上述したように作成することができる。

【0078】

1. B. G-CSF直接融合物

DNA鋳型としてプラスミドpBBT174を使用してPCRによりG-CSF-IgG1-Fc直接融合物を作成した。第1のPCR反応はオリゴBB202 (5'-CACCTTGCCCCAGCCCCAGCCCCAAATCTTGTGACAAA-3') (配列番号30) およびBB82を使用した。第2のPCR反応はオリゴBB203 (5'-ACAAGATTTGGGCTCGGGCTGGCAAGGTGGCGTAG-3') (配列番号31) およびBB91を使用した。これらのPCR反応の生成物をゲル精製し、混合し、オリゴBB82とBB91を使用して第3のPCR反応を行った。約1300bpのPCR生成物をゲル精製し、PflM1およびSac I Iにより消化し、~400bpのPflM1/Sac I I断片をゲル精製した。この断片を、ウシ腸腸ホスファターゼで処理されている同様に切断されたpBBT174に入れてクローニングした。正しい挿入物を有するクローンをDNA配列決定により同定し、pBBT299と称した。

【0079】

DNA鋳型としてプラスミドpBBT175を使用してPCRによりG-CSF-IgG4-Fc直接融合物を作成した。1つのPCRはオリゴBB204 (5'-CACCTTGCCCAGCCCGAGTCCAAATATGGTCCC CCA-3') (配列番号32) およびBB82を使用した。第2のPCR反応はオリゴBB205 (5'-ACCATATTTGGACTCGGGCTGGG CAAGGTGGCGTAG-3') (配列番号33) およびBB91を使用した。これらのPCR反応の生成物をゲル精製し、混合し、オリゴBB82とBB91を使用して第3のPCR反応をさせた。約1300bpのPCR生成物をゲル精製し、PflM1およびSac IIにより消化させ、~400bpのPflM1/Sac II断片をゲル精製した。この断片を子ウシ腸ホスファターゼで処理されている同様に切断されたpBBT175に入れてクローニングした。正しい挿入物を有するクローンを有するクローンを同定し、pBBT300と称した。

【0080】

COS細胞をpBBT299およびpBBT300で形質移入し、実施例2で説明したようにG-CSF-IgG1-FcおよびG-CSF-IgG4-Fc直接融合タンパク質を精製した。精製タンパク質は主にジスルフィド架橋二量体(>90%)からなり、NFS60細胞の増殖を刺激し、EC₅₀は50-60 pg/ml (G-CSF-IgG1-Fc直接融合物) および43-50 pg/ml (G-CSF-IgG4-Fc直接融合物) であった。バイオアッセイを実施例3で説明したように実行した。

【0081】

2. 2または4アミノ酸リンカーを含むGF-IgG融合タンパク質

ジペプチド[ser-gly]リンカーを作成するために、ヒンジコード配列に5'延長部CGCTCCGGAを付加した5'オリゴヌクレオチドによりIgG1-Fc配列をPCRすることができる。TCCGGAヘキサヌクレオチドは制限エンドヌクレアーゼBsp EIに対する開裂部位であり、アミノ酸ser-glyをコードする。このPCR断片をBsp EIおよびSac IIで消

化し、～240bp断片を同様に切断されたpCDN3.1(+):EPO-IgG1-FcおよびpCDN3.1(+):G-CSF-IgG1-Fcに入れてクローニングすることができる。これらのプラスミドのそれぞれにおける固有のBspEI部位は、リンカー[ser-gly-gly-ser-gly-gly-ser]の最初のser-glyで現れる。そのため、得られた組換え体はこの2アミノ酸、すなわちser-gly、から成るリンカーを含む。新しく挿入された～250bp BspI-SacIIの配列を確認することができる。

【0082】

同様の手順を使用して、4アミノ酸[ser-gly-gly-ser]リンカーを作成することができる。ヒンジコード配列に5'延長部CGCGGATCCを付加した5'オリゴヌクレオチドによりIgG1-Fc配列をPCRすることができる。GGATCCヘキサヌクレオチドは制限エンドヌクレアーゼBam

HIに対する開裂部位であり、アミノ酸gly-serをコードする。このPCR断片をBamHIおよびSacIIで消化し、～240bp断片を同様に切断されたpCDN3.1(+):EPO-IgG1-FcおよびpCDN3.1(+):G-CSF-IgG1-Fcに入れてクローニングすることができる。これらのプラスミドのそれぞれにおける固有のBamHI部位は、リンカー[ser-gly-gly-ser-gly-gly-ser]の最初のgly-serで現れる。そのため、組換え体は4アミノ酸(ser-gly-gly-ser)から成るリンカーを含む。新しく挿入された～250bp BamHI-SacII片の配列を確認することができる。

【0083】

増殖因子/部位カインドメインとIgG1-Fcドメインとの間に2アミノ酸SerGlyリンカーを含む融合タンパク質を作成するために使用することができるIgG1-FcドメインをPCRにより作成した。PCR反応ではBB194(5'-CGCGAATTCGCGAGAGCCCAAATCTTGTGACAAA3') (配列番号34)とBB82を使用した。DNA鋳型はpBBT195とした。PCR生成物をPCRクリーンアップキット(キアゲン社(Qia

gen, Inc.)) にか、EcoRIおよびSacIIにより消化した。制限消化物をPCRクリーンアップキットにか、子ウシ腸ホスファターゼにより処理した、同様に切断されたpBCSK(+) (ストラタジーン社 (Stratagene, Inc.)) DNAに入れてクローニングした。ライゲーションを用いてE. coli JM109の形質転換を行った。50 μ g/mlのクロラムフェニコールを含むLB寒天平板上で形質転換体の選択を行った。正しい配列を有するクローンをDNA配列決定により同定し、pBBT242と称した。

【0084】

増殖因子／部位カインドメインとIgG1-Fcドメインとの間に4アミノ酸Ser-Gly-Gly-Ser (配列番号1) リンカーを含む融合タンパク質を作成するために使用することができるIgG1-FcドメインをPCRにより作成した。PCR反応ではプライマーBB195 (5'-CGCGGATCCGAGCCCAAATCTTGTGACAAA-3') (配列番号35) とBB82を使用した。DNA鋳型はpBBT195とした。PCR生成物をPCRクリーンアップキット (キアゲン社 (Qiagen, Inc.)) にか、BamHIおよびSacIIにより消化した。制限消化物をPCRクリーンアップキットにか、子ウシ腸ホスファターゼにより処理した、同様に切断されたpBCSK(+) DNAに入れてクローニングした。ライゲーションを用いてE. coli JM109の形質転換を行った。50 μ g/mlのクロラムフェニコールを含むLB寒天平板上で形質転換体の選択を行った。正しい配列を有するクローンをDNA配列決定により同定し、pBBT243と称した。

【0085】

増殖因子／部位カインドメインとIgG4-Fcドメインとの間に2アミノ酸リンカーSerGlyを含む融合タンパク質を作成するために使用することができるIgG4-FcドメインをPCRにより作成した。PCR反応ではプライマーBB196 (5'-CGCGAATTCGCGAGAGTCCAAATATGGTCCCCCA-3') (配列番号36) とBB82を使用した。DNA鋳型はpBBT196とした。PCR生成物をPCRクリーンアップキット (キアゲン社 (Qiagen, Inc.)) にか、EcoRIおよびSacIIにより

消化させた。制限消化物をPCRクリーンアップキットにかけ、子ウシ腸ホスファターゼにより処理した、同様に切断されたpBC (SK+) DNAに入れてクローニングした。ライゲーションを用いてE. coli JM109の形質転換を行った。50 μ g/mlのクロラムフェニコールを含むLB寒天平板上で形質転換体の選択を行った。正しい配列を有するクローンをDNA配列決定により同定し、pBBT244と称した。

【0086】

増殖因子／部位カインドメインとIgG4-Fcドメインとの間に4アミノ酸リンカーser-gly-gly-serを含む融合タンパク質を作成するために使用することができるIgG4-FcドメインをPCRにより作成した。PCR反応ではプライマーBB197 (5' -CGCGGATCCGAGTCCAAATATGGTCCCCCA-3') (配列番号37) とBB82を使用した。DNA鋳型はpBBT196とした。PCR生成物をPCRクリーンアップキット(キアゲン社(Qiagen, Inc.))にかけ、BamHIおよびSacIIにより消化した。制限消化物をPCRクリーンアップキットにかけ、子ウシ腸ホスファターゼにより処理した、同様に切断されたpBC (SK+) DNAに入れてクローニングした。ライゲーションを用いてE. coli JM109の形質転換を行った。50 μ g/mlのクロラムフェニコールを含むLB寒天平板上で形質転換体の選択を行った。正しい配列を有するクローンをDNA配列決定により同定し、pBBT245と称した。

【0087】

修飾した上記IgGドメインを使用して、4アミノ酸リンカーを含むEPO-IgGおよびG-CSF-IgG融合タンパク質を作成した。プラスミドpBBT174およびpBBT180をBamHIおよびSacIIで消化し、子ウシ腸ホスファターゼで処理した。～6kbのベクターバンドをゲル精製し、BamHIおよびSacIIによるpBBT243 DNAの消化後にゲル精製したpBBT243からの～800bp IgG挿入物とライゲートした。同様に、プラスミドpBBT175およびpBBT181をBamHIおよびSacIIで消化し、子ウシ腸ホスファターゼで処理した。～6kbのベクターバンドをゲル精

製し、BamHIおよびSacIによるpBBT245 DNAの消化後にゲル精製したpBBT245からの～800bp I g G挿入物とライゲートした。ライゲーションを使用してE. coli DH5αの形質転換を行い、100 μg/mlアンピシリンを含むLB寒天平板上で形質転換体の選択を行った。正しい配列を有するクローンを制限マッピングおよびDNA配列決定により同定した。4アミノ酸リンカーを含むEPO-I g G1-FcおよびEPO-I g G4-Fc融合物をそれぞれ、pBBT279およびpBBT280と称した。4アミノ酸リンカーを含むG-CSF-I g G1-FcおよびG-CSF-I g G4-Fc融合物をそれぞれ、pBBT277およびpBBT278と称した。

【0088】

修飾した上記I g Gドメインを使用して、2アミノ酸リンカーを含むEPO-I g GおよびG-CSF-I g G融合タンパク質を作成することができる。プラスミドpBBT174およびpBBT180をBspEIおよびSacIで消化し、子ウシ腸ホスファターゼで処理することができる。～6 kbのベクターバンドをゲル精製し、BspEIおよびSacIによるpBBT242 DNAの消化後にゲル精製したpBBT242からの～800bp I g G挿入物とライゲートすることができる。同様に、プラスミドpBBT175およびpBBT181をBspEIおよびSacIで消化し、子ウシ腸ホスファターゼで処理することができる。～6 kbのベクターバンドをゲル精製し、BspEIおよびSacIによるpBBT244 DNAの消化後にゲル精製したpBBT244からの～800bp I g G挿入物とライゲートすることができる。ライゲーションを使用してE. coli DH5αの形質転換を行い、100 μg/mlアンピシリンを含むLB寒天平板上で形質転換体の選択を行った。

【0089】

組換え融合タンパク質は、COS細胞を形質移入するのに使用することができる、実施例2で説明したように精製することができる。これらの融合タンパク質のインビトロおよび生体内生物活性を、実施例3および8において説明したように決定することができる。

【0090】

(実施例5)

IgG-C_H融合タンパク質の生物活性を改善するための方法

IgG-C_H融合タンパク質はすべて精製中に凝集したようであり、融合増殖因子の比活性は類似IgG-Fc融合物に比べて～2-3倍減少した。凝集は普通は軽鎖と結合するC_HIドメインが関係する疎水性相互作用によるものである可能性がある。Ig軽鎖のGF-IgG-C_H融合物との同時発現により凝集を防止することができる。以下、Ig軽鎖とIg重鎖を同時発現させる3つの方法を説明する。以下で説明する実験では例としてIgG-Fc、IgG-C_H、EPOおよびG-CSFを使用するが、他のGFまたはIgGドメイン、他のIgGサブタイプに対するドメイン、およびIgM、IgA、IgDおよびIgE抗体からのドメインに対し同様の手順を使用することができる。ヒトκおよびλ軽鎖のDNA配列は周知である(Heiterら、1980年)。ヒトκおよび/またはλ軽鎖定常(C_L)領域のcDNA配列は、ヒト白血球一本鎖cDNA(クロンテック(Clonotech))またはヒトゲノムDNA(クロンテック)からPCR増幅により得ることができる。クローニングしたC_LドメインのDNA配列は、下記の実験において使用する前に確認することができる。修飾した融合タンパク質を発現させ、精製させることができ、その比活性を実施例2および3において説明したようにインビトロバイオアッセイにおいて決定することができる。

【0091】

1. 軽鎖定常領域の同時発現

コザック(Kozak)配列(Kozak、1991年)と分泌シグナルを軽鎖定常領域の5'端に付加し、軽鎖定常領域の翻訳開始を促進し、その分泌を誘導することができる。翻訳停止コドンとその配列の3'端に付加することができる。適当なクローニング部位を5'および3'端に付加すると、RSVプロモータの制御下でクローニングして哺乳類細胞発現ベクターpREP4(インビトロゲン(Invitrogen))とすることができ、SV40誘導ポリA付加部位に先行させることができる。この構成を使用して、例えばEPO-IgG-C_HおよびG-CSF-IgG-C_Hを発現するpCDNA3.1(+)誘導体と共に

にCOS細胞を同時形質移入することができる。その代わりに、軽鎖および重鎖の両方を単一プラスミド構成から発現させることができる。この場合、軽鎖配列および側面のプロモータおよびpREP4からのポリA部位は適当な制限酵素により削除することができ、クローニングしてpCDNA3.1(+)とすることができる。EPO-IgG-CHおよびG-CSF-IgG-CHコード配列をその後クローニングして、CMVプロモータの制御下でpCDNA3.1(+)ポリリンカーとすることができるであろう。

【0092】

ヒトκ軽鎖の定常領域(IgKC)をコードするDNAを、この実施例の2節で説明されているようにヒトゲノムDNAから増幅した。この配列をPCRにより修飾して軽鎖定常領域の発現に適した構成を作成した。コザック配列(Kozak, 1991年)およびヒト成長ホルモン分泌シグナルを軽鎖定常領域の5'端に付加した。これらの修飾は2回の連続PCR反応により行った。第1に、クローニングされ配列決定されたpCDNA3.1(+)::fusigKC DNAを鋳型として使用した。プライマーはBB169(5'>GCTTTTGGCCTGCTCTGCCTGCCCTGGCTTCAAGAGGGCAGTGCCACTGTGGCTGCACCATCT>3)(配列番号38)およびBB150(5'>CGCTCTAGACTAACACTCTCCCCTGTTGAA>3)(配列番号39)とした。順方向プライマーBB169は軽鎖定常領域の5'端にアニールし、hGHリーダー配列の15アミノ酸をコードする配列を付加する。逆方向プライマーBB150はヒトκ軽鎖の定常領域に対するコード配列の3'端にアニールし、XbaI部位へと続く翻訳停止コドンを含む。このPCR反応生成物をゲル精製し、プライマーBB168(5'>CGCAAGCTTGCCACCATGGCTACAGGCTCCCGGACGTCCCTGCTCTGGCTTTTGGCTGCTCTGC>3)(配列番号40)およびBB150を用いる第2のPCR反応における鋳型として使用した。順方向プライマーBB168はhGHリーダー配列の残りをコザック配列と共に付加し、クローニング目的のHindIII部位を含む。逆方向プライマーBB150は上述した通りである。このPCR反応生成物をHindIIIおよびXbaIで

消化し、HindIIIおよびXbaIで消化されアルカリホスファターゼで処理したベクターpCDN3.1(+)に入れてクローニングした。DNA配列を1つのそのようなクローンに対し確認した。

【0093】

2. GF-軽鎖定常領域融合タンパク質の同時発現

軽鎖発現の他のモードは5'端を修飾し、CLコード配列のアミノ酸末端に融合された柔軟なペプチドリンカー配列の一部を追加すると共にその配列の3'端に翻訳停止コドンを追加するものである。適当なクローニング部位を5'および3'端に付加すると、プラスミドpCDN3.1(+)::EPOfusおよびpCDN3.1(+)::G-CSFfusに入れてクローニングされるEPOおよびG-CSF遺伝子に対するインフレーム融合としてのクローニングが可能となる。このプラスミドを、例えばEPO-IgG1-C_HおよびG-CSF-IgG1-C_Hを発現するプラスミドと共にCOS細胞に同時形質移入することができる。この場合、重鎖および軽鎖はどちらも増殖因子融合物を含む。軽鎖および重鎖は、やはり上述したように単一pCDNA3.1(+)構成から発現させることができるであろう。EPOおよびG-CSFも、やはり実施例で説明した手順と類似の手順を使用してIg-C_Lとの直接融合物として発現させることもできる。

【0094】

ヒトκ軽鎖の定常領域(IgKC)をコードするDNAを、プライマーBB149(5'>CGCGGATCCGGTGGCTCAACTGTGGCTGCACCATCTGT>3')(配列番号41)およびBB150(5'>CGCTCTAGACTAACACTCTCCCCTGTTGAA>3')(配列番号42)を用いてヒトゲノムDNAから増幅した。順方向プライマーBB149はヒトκ軽鎖の定常領域に対するコード配列の5'端にアニールし、5'端にBamHI部位を含むペプチドリンカーの一部(gly-ser-gly-gly-ser)(配列番号2)を含む。逆方向プライマーBB150はヒトκ軽鎖の定常領域に対するコード配列の3'端にアニールし、XbaI部位へと続く翻訳停止コドンを含む。得られた~330bpPCR生成物をBamHIおよびXbaI

により消化し、ゲル精製し、Bam HIおよびXba Iで消化されアルカリホスファターゼで処理され、ゲル精製されているベクターpCDN3.1 (+)に入れてクローニングした。1つのクローンの配列決定を行うと、公表されているヒトIgKCゲノムDNA配列(Hietterら、1980年)に匹敵することがわかった。その後、330Bam HI-Xba I断片をこのプラスミドから削除し、pCDN3.1 (+) : : fus IgKCと称し、クローニングしpBBT190、pBBT191、pBBT192とした(以下の実施例10において説明)。これらはそれぞれ、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ へのIgKCドメインの融合物となる。同様の手順を使用して、他の増殖因子/部位カイン- IgKC融合タンパク質を作成することができる。

【0095】

3. 軽鎖-重鎖融合物

「同時発現」の第3のモードはCLコード配列の5' および3' 端を修飾して、両端に柔軟なペプチドリンカーの一部を組み込むものである。適当なクローニング部位(例えば、Bsp EIおよびBam HI)をも組み込むことにより、そのような構成をpCDN3.1 (+)におけるEPO-IgG-C_HおよびG-CSF-IgG-C_H融合物の柔軟なペプチドリンカー内のBsp EIおよびBam HI部位に挿入することができる。得られた構成は、例えば単一ポリペプチド[EPO]-[CL]-[IgG-C_H]および[G-CSF]-[CL]-[IgG-C_H]融合物をコードする。重鎖CH1ドメインのアミノ末端への軽鎖定常領域のカルボキシ末端の融合は一本鎖Fvポリペプチドに類似する。長さ14から20残基のオーダーの(ser-gly-gly)モチーフから成るフレキシブルペプチドリンカーを使用して、軽鎖可変領域のカルボキシ末端を重鎖可変ドメインのアミノ末端に融合させ(Stewartら、1995年)、CLドメインをIgG-C_Hドメインに結合させることができる。

【0096】

(実施例6)

補体結合およびFc受容体結合特性が減少したGF-IgG融合タンパク質
一定のGF-IgG融合タンパク質は、補体の活性化あるいはFc受容体結

合に関連する免疫プロセスにより、毒性があるか、あるいは動物モデルにおける効力に欠けていることがある。この理由のため、GF-IgG4融合タンパク質が好ましいことがある。というのは、IgG4は補体活性化およびFc受容体結合における効果がIgG1よりも低いからである(Roitら、1989年)。EPO-およびG-CSF-IgG4-Fc融合タンパク質は、インビトロバイオアッセイではIgG1-Fc融合タンパク質と同じか、あるいはほとんど同じ効力を有する。その代わりに、以下に詳細を示すように、インビトロ突然変異誘発実験を実行し、補体活性化およびFc受容体結合の原因となることがわかっているIgGドメイン中の特定アミノ酸を変更することができる。修飾した融合タンパク質を実施例2および3で説明したように、発現、精製させ、その比活性をインビトロバイオアッセイで決定することができる。

【0097】

A. 補体結合

補体活性化において役割を果たすIgG中のアミノ酸はIgG CH2ドメインに局限化されている。とりわけ、ヒトIgG1中のアミノ酸Glu318、Lys320、Lys322、Ala330およびPro331は、補体活性化に寄与するものとして考えられている(Isaacsら、1998年)。IgG1中のGlu318、Lys320、Lys322をアラニン残基と置換すると、補体を活性化する能力が減少したIgGタンパク質となる(Isaacsら、1998年)。IgG4のアミノ酸配列はこの領域ではIgG1と同一であるが、IgG4は補体を活性化しない。IgG4を使用する代わりに、実施例1で説明したPCRを用いる突然変異誘発戦略を用いて、IgGのGlu318、Lys320、Lys322残基を有するIgGのこれらの残基を(単独で、あるいは組み合わせで)アラニン残基または補体活性化を減少させる他のアミノ酸に変えることができる。

【0098】

B. Fc受容体結合

ヒトIgGサブクラスはFc受容体に結合する能力および抗体依存性細胞媒介細胞障害(ADCC)を刺激する能力が異なる。IgG1、IgG3およびIg

G4は最もADCCを刺激し、IgG2ではADCCを刺激する能力がかなり減少する(Roittら、1989年)。ADCCは免疫細胞上のFc受容体への抗体の結合が関係するメカニズムにより起こる。Fc受容体の原因となるアミノ酸はIgG分子のCH2ドメインに局限化されている。とりわけ、アミノ酸233-235はFc受容体結合に関係している。ヒトIgG1はこの領域にアミノ酸配列GluLeuLeuを有し、Fc受容体に結合しないIgG2はProAlaVal配列を有する。IgG4はこの領域にGluPheLeu配列を有し、IgG1に比べ、Fc受容体結合に対し10倍効力が低い。IgG1またはIgG4の233-235位置でGluLeuLeuをIgG2のProAlaVal配列に変えると、Fc受容体結合およびADCCに対する能力がかなり減少したIgG1およびIgG4抗体となる(Isaacsら、1998年)。実施例1で説明したPCRを用いる突然変位誘発戦略を用いると、GF-IgG融合タンパク質構成にこれらのアミノ酸変化のいくつかまたは全てを導入することができる。その代わりに、IgG1 CH2ドメイン内のアスパラギン297(あるいは他のIgGサブクラスの同等のアスパラギン残基)のグリコシル化が防止される修飾GF-IgG融合タンパク質を作成することができる。グリコシル化されたIgG1抗体では、グリコシル化されたIgG1抗体に比べ、Fc受容体に結合する能力および標的細胞を溶解する能力がかなり減少する(Isaacsら、1998年)。アスパラギン297をグルタミンまたは他のアミノ酸に変えることにより、あるいはグリコシル化認識配列(アスパラギン-X-セリン/トレオニン)の一部であるトレオニン299をアラニンまたはセリン以外のアミノ酸に変えることによりGF-IgG融合タンパク質の無グリコシル化バージョンを作成することができる。グリコシル化認識配列のX位置のアミノ酸、すなわちアミノ酸298もプロリンに変えて、IgG CH2ドメインのアスパラギン297のグリコシル化を防止することができる。

[0099]

(実施例7)

GF-IgG融合タンパク質を用いた薬物動態学実験

薬物動態学実験を行い、GF-IgG融合タンパク質が対応する非融合タンパ

ク質より長い循環半減期を有することを証明することができる。静脈薬物動態学データおよび皮下薬物動態学データの両方を得ることができる。静脈送達データから末端薬物動態パラメータを計算することができる。

【0100】

静脈送達試験では、ラット（～350g）にIgG1-Fc融合タンパク質（EPOまたはG-CSF）または対応する非融合タンパク質（EPOまたはG-CSF）の静脈ボーラス注射（0.1mg/kg）を受けさせ、タンパク質の循環レベルを144時間にわたって測定することができる。各タンパク質サンプルに対し3匹のラットを使用することができる。静脈注射後、0、0.08、0.5、1.5、4、8、12、24、48、72、96、120、144時間目に血液サンプルを採取することができる。試験タンパク質の血清レベルを市販のEPOおよびG-CSF ELISAキット（R&Dシステムズ）を用いて定量することができる。各血液サンプルの連続希釈物を最初にインビトロパイオッセイで分析し、ELISAの直線領域（EPOでは0.025から1.6ng/ml、G-CSFでは0.04から2.5ng/ml）内にある希釈物を同定することができる。滴定実験を行い、IgG1-Fc融合タンパク質および対応する非融合タンパク質を検出するためのELISAの相対感度を決定することができる。皮下送達試験は送達経路を除き静脈試験と同じプロトコルに従うことができる。試験タンパク質の血清レベルを上述したようにELISAにより定量することができる。

【0101】

（実施例8）

EPO-IgG1-FcおよびG-CSF-IgG1-Fc融合タンパク質のインビボ効力は、正常なラットおよびマウスで示されうる。これらの研究では、適切な用量および投与スケジュールを確認するために種々の用量および投与スケジュールを使用できる。EPO-IgGおよびG-CSF-IgG融合タンパク質の効力も、適切な疾病モデル-EPO-IgG1-Fcに関しては貧血、およびG-CSF-IgG1-Fcに関しては好中球減少症で示されることができ。薬物動態学実験は、動物研究のために使用されるIgG1融合タンパク質につ

いての投与スケジュールを決定する指針を提供するであろう。他の Ig G-Fc 融合タンパク質を用いた公表結果 (Richterら、1999; Zengら、1995) から、EPO-IgG および G-CSF-IgG 融合タンパク質は、1 日おきまたは 3 日毎、およびおそらくより少なく、例えば単回注射で投与されるときに効果がありうる。投与スケジュールは、薬物動態学的研究の結果、当初の動物効力の結果によって修飾されなければならないかもしれない。げっ歯類に対する注射当たりの投与されるタンパク質の用量は、薬物動態学的実験の結果、当初の動物効力結果に基づいて修飾されなければならないかもしれない。

【0102】

A. EPO 動物効力モデル-正常ラット

1. 単回注射:

各~320gの体重のスプレーグ・ダウレイ (Sprague Dawley) のラットの群は、それぞれ100 μ g/kgの用量で、そのカルボキシ末端にアミノ酸配列 $\text{ser-gly-gly-ser-gly-gly-ser-asp-tyr-lys-asp-asp-asp-asp-lys}$ (配列番号43) (rEPO-FLAG) を含む野生型組換えEPO、またはEPO-IgG1-Fcの単回静脈内注射 (側方尾部静脈) を受けた。rEPO-FLAGは、COS-1細胞の形質移入によって発現され、そして抗-FLAGモノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製された。rEPO-FLAGおよびEPO-IgG1-Fcのタンパク質濃度は、ブラッドフォードの染料結合アッセイ、および標準としてウシ血清アルブミンを用いて測定された。選択された時点で、血液試料 (0.3~0.4 ml) を、ラットから、EDTA 抗凝固剤試験管に抜いた。アリコート量の血液試料を、全血細胞 (CBC) 計数について分析した。血液試料の残りを、遠心分離し、そして血漿を-80℃で凍結した。血液試料を、注射後0.25、2、4、10、24、48、72、96、120、144、168および192時間に抜いた。0時間目のベースラインは、試験化合物の注射の~24時間前に得た。表4は、0時間で、および注射の192時間後での異なる試験群についての平均血液ヘマトクリット (\pm SE) を示す。EPO-IgG1-Fcを受ける群は、0時間と比べた192時間で

のヘマトクリットレベルで有意な増加を示した ($p < 0.05$)。rEPO-FLAGは、0時間と192時間の時点との間のヘマトクリットレベルに有意な増加を示さなかった。

【0103】

【表5】

表4

群	ヘマトクリット (%)	
	0 時間	192 時間
rEPO-FLAG	42.9 +/- 0.85	44.4 +/- 1.007
EPO-IgG1-Fc	44.7 +/- 0.296	*48.0 +/- 0.95

*0時間の地点に対して $p < 0.05$

同様の研究は、より低い、またはより高い用量 (0.001~10mg/kg) のタンパク質を用いて行うことができる。同様の研究は、タンパク質の投与の皮下経路を用いても行うことができる。

【0104】

2. 毎日、1日おきまたは3日毎の投与スケジュール

スプレーグ・ダウレイのラット (~200g) は、チャールズリバー社、マサチューセッツ州ウィルミントン所在 (Charles River, Wilmington, MA) のような商業供給者から購入される。先の研究は、皮下注射による1日当たり1回の100~1000IU/kg (およそ800ng~8μg/kg) のrEPOの投与 (160ng~1.6μgSID/200gラット) が、げっ歯類でのヘマトクリットおよび赤血球生成における有意な増加を与えることを示した (Matsumotoら、1990; Vaziriら、1994; Baldwinら、1998; Sytkowskiら、1998)。5匹のラットの群は、5~9日の間、特定の間隔 (毎日、1日おきまたは3日毎) で、rEPO、rEPO-FLAG、EPO-IgG1-Fcまたはプラセボ (ベヒクル溶液) の皮下注射を受ける可能性がある。EPOのモル比に等価な用量 (EPO-IgG1-Fc融合タンパク質の400ng~4μg/200gラット) が試験される。より高い、またはより低い用量も、試験される。広範なEPO-IgG1-Fc用量 (500倍を超える変動) は、これらの当初の実験で試

験して、用量の内の1つが効果がある見込みを増大できる。多すぎるEPO-IgG1-Fcの投与が、毒性のために赤血球生成を妨害する可能性がある。対照ラットは、ベヒクル溶液のみを受けることができる。さらなる対照群は、rEPOの毎日の注入（5～9日間、160 ng～1.6 μ g/200 gラット）、およびEPO-IgG1-Fcと同じ投与計画を用いて160 ng～1.6 μ gのrEPOを受けることができる。最終の注射の1日から2日後に、その動物を屠殺し、そして血液試料を、ヘマトクリットおよび全血細胞数（CBC）分析のために収集できる。造血組織（肝臓および脾臓）が収集され、秤量され、そして増加した赤血球生成の証拠を求める組織病理学的分析のためにホルマリンで固定することができる。骨髄は、赤血球生成が増加した証拠を求めるために、種々の長骨、そして単位粒子調製および組織病理学的分析については胸骨から取り出されることができる。群の間の比較は、単独比較についてはスチューデントT検定を、そして多重比較についての差異の一方分析を利用できる。 $P < 0.05$ は、有意であると考えられる。

【0105】

rEPOの毎日の注射は、ラットでヘマトクリットおよび赤血球生成における増加を刺激できるのに対して、同じ用量のrEPOの頻繁でない投与は、刺激できないか、またはより少ない範囲まで刺激する。これらのパラメーターでの用量依存性の増加は、EPO-IgG-Fc処置動物で観察することができる。これらのパラメーターにおけるより大きな増加は、頻度の少ない投与スケジュールを用いたEPOで処置された動物においてよりもEPO-IgG1-Fc処置動物で観察することができる。明らかに少ないEPO-IgG1-Fcは、EPOの毎日の注射で得られるこれらのパラメーターにおける同じ増加を達成するために要求される。

【0106】

頻度のより低い投与、例えば単回注入を用いたさらなる実験を行うことができる。

B. EPO効力実験—貧血ラットモデル

シスプラチン誘導貧血は、化学療法誘導貧血の十分特徴付けられたげっ歯類モ

デルであり、そしてヒトの臨床設定に直接的関連性を示す。r EPOは、100～1,000単位/kgの毎日用量で投与されるときに、このモデルにおける貧血を逆行させる(Matsumotoら、1990; Vaziriら、1994; Baldwinら、1998)。EPO-IgG-Fcも、1日当たり1回、1日おき、または3日毎の投与スケジュールを用いて、このモデルでの貧血を逆行させるときに効果がある。この実験で使用されるEPO-IgG-Fcについての投与スケジュールは、正常なラットの実験で最高に作用したものでありうる。スプレーグ・ダウレイラット(～200g)に、貧血を誘発するために、0日目に、シスプラチン(3.5mg/kg)の腹腔内注射で処理し、そして種々の処置群に無作為化できる。ラットは、9日間まで、2μg～20μg/kgの用量で、毎日、1日おきに、または3日毎に、EPO-IgG-Fc、r EPOまたは生理食塩水の注射を受けることができる。ラットの1つの対照群は、毎日、r EPOの皮下注射(100～1,000単位/kg)を受けることができる。別の対照群は、当初のシスプラチンを受けることができないが、しかし他の試験タンパク質と同様の投与スケジュールを用いて生理食塩水の注射を受け得る。9日目に、ラットは、屠殺され、そして血液および組織試料は、包括的なCBCおよび組織病理学的分析のために得ることができる。10～100倍高いか、または低い用量のEPO-IgG-Fc融合タンパク質も試験することができる。

【0107】

C. G-CSF動物効力モデル

G-CSF-IgG融合タンパク質(C17またはC17Sのバージョン)のインビボ効力は、タンパク質が、ベヒクル処理動物に比較した循環中の好中球レベルおよび顆粒球形成における増大を刺激することを示すことによって、正常または好中球減少症のマウスまたはラットのようなげっ歯類で測定されうる。G-CSFは、100μg/kgの用量で、正常および好中球減少症のげっ歯類での好中球レベルを刺激する(Kubotaら、1990; Kangら、1995)。マウスまたはラットは、これらの実験のために使用されうる。タンパク質クリアランスが、体重に比例するので、ラットからマウスまでの薬物動態学的データを推定できる(Mahmood、1998)。毎日、1日おき、または3日毎の

投与スケジュールを用いた、正常な動物におけるG-CSF-IgG1-Fcの効力を示すことができる。効力は、単回注射に引き続いて示されうる。マウス好中球減少症モデルにおけるG-CSF-IgG1-Fcの有効性も、毎日、1日おき、または3日毎の投与スケジュールを用いて示されることができる。

【0108】

C. 1. 単回注射に続く正常なラットにおける効力

それぞれが~320gの体重の3匹の雄スプレーグ・ダウレイのラットの群は、野生型組換えG-CSF（ボルダー・バイオテクノロジー社（Boilder BioTechnology））、Neupogen（Neupogen）（登録商標）（アムジェン社（Amgen, Inc.）によって販売されている組換えG-CSF）またはG-CSF-IgG1-Fcの単回の静脈内注射（外側尾部静脈）を、各々100μg/kgの用量で受けた。タンパク質濃度は、標準としてウシ血清アルブミンを用いたブラッドフォード染色結合アッセイを用いて測定された。選択された時点で、血液試料（0.3~0.4ml）を、ラットからEDTA抗凝固試験管に抜取った。アリコート量の血液試料は、全血細胞（CBC）数について分析された。残りの血液試料を遠心分離し、そして血漿を、-80℃で凍結させた。血液試料を、注射後0.25、1.5、4、8、12、16、24、48、72、96、120および144時間に抜いた。0時間のベースラインの試料は、試験化合物の注射の~24時間前に得られた。表5、6および7は、様々な試験群についての平均血中好中球、総白血球細胞数および血中単核細胞数を経時的に示す。3つの試験化合物全ては、ベースラインの値より末梢の白血球細胞および好中球における増加を刺激した。野生型組換えG-CSFおよびNeupogen（登録商標）を受けている試験群についての白血球細胞および好中球数は、注射の~24時間後にピークに達し、そして~48時間までにベースラインの値に戻った。対照的に、G-CSF-IgG1-Fcを受けているラットについての白血球細胞および好中球数は、注射の~48時間後にピークに達したが、注射の~96時間後までベースラインの値に達しなかった。G-CSF-IgG1を受けているラットで観察された白血球細胞および好中球レベルのピークは、野生型組換えG-CSFまたはNeupogen（登録商標）を受

けている群についてよりも有意に高かった ($p < 0.05$)。データは、G-CSF-IgG1が、循環の好中球および白血球細胞における増大を刺激する能力があること、および末梢の白血球細胞数および好中球における絶対増加が、低モル用量の融合タンパク質を使用した場合でさえ、組換え野生型G-CSFまたはNeupogen (登録商標)で見られるものより大きく、そして長く続くことを示す。G-CSF-IgG1-Fcは、経時的に血中単核細胞レベルにおける有意な増加をも刺激した (表7)。同様の実験は、他のG-CSF-IgGおよびG-CSF (C17S)-IgG融合タンパク質 (FcまたはC#バージョン) の効力を示すために行うことができる。同様の研究は、タンパク質の投与のための皮下経路を用いても行うことができる。

【0109】

【表6】

表5

1回のタンパク質の静脈内投与 ($100 \mu\text{g}/\text{kg}$) に続く
G-CSF, Neupogen[®] および G-CSF-IgG1-Fc^a
好中球血液細胞数に及ぼす影響

時間 (時)	好中球 平均 \pm SE (細胞/ μl 血液)		
	G-CSF ^a	Neupogen	G-CSF-IgG1-Fc
0	1,147 \pm 167	1,906 \pm 564	2,951 \pm 342
4	6,752 \pm 923	4,504 \pm 549	^a 4,484 \pm 328
8	8,437 \pm 546	5,525 \pm 894	^a 7,309 \pm 890
12	10,744 \pm 549	11,891 \pm 1,545	^a 9,796 \pm 1,649
24	11,035 \pm 788	11,148 \pm 977	^a 13,655 \pm 2,367
48	2,355 \pm 218	2,610 \pm 245	^{a,c} 14,554 \pm 1,683
72	2,113 \pm 438	3,077 \pm 590	^a 6,235 \pm 797
96	2,086 \pm 496	2,675 \pm 673	3,292 \pm 309
120	2,179 \pm 373	2,063 \pm 469	3,115 \pm 342

a Bolder BioTechnology, Inc. で製造された野生型G-CSF

b 0時間の好中球レベルに対して $P < 0.05$ c 同じ時刻のG-CSFおよびNeupogenに対して $P < 0.05$

【表7】

表6

1回のタンパク質の静脈内投与(100 μ g/kg)に続く
 G-CSF, Neupogen[®] および G-CSF-IgG1-Feが
 白血球細胞数に及ぼす影響

時間 (時)	白血球 平均+/-SE (細胞/ μ 血液)		
	G-CSF ^a	Neupogen ^b	G-CSF-IgG1-Fe ^c
0	11,100 +/- 252	11,100 +/- 829	14,000 +/- 669
4	16,000 +/- 1,059	13,600 +/- 570	13,600 +/- 186
8	15,200 +/- 371	14,900 +/- 260	15,300 +/- 1,670
12	18,400 +/- 240	20,100 +/- 674	19,400 +/- 2,058
24	23,900 +/- 1,110	25,500 +/- 1,734	^{b,c} 29,300 +/- 2,894
48	14,700 +/- 426	15,300 +/- 1,715	^{b,c} 33,100 +/- 2,099
72	15,300 +/- 426	14,800 +/- 764	^{b,c} 21,200 +/- 2,228
96	14,200 +/- 1,000	14,700 +/- 689	15,400 +/- 133
120	11,000 +/- 2,651	11,300 +/- 1,477	12,900 +/- 2,052

a Bolder BioTechnology, Inc.で製造された野生型G-CSF

b 0時間の白血球レベルに対してP<0.05

c 同じ時刻のG-CSFおよびNeupogenに対してP<0.05

【表8】

表7

1回のタンパク質の静脈内投与(100 μ g/kg)に続く
 G-CSF, Neupogen[®] および G-CSF-IgG1-Feが
 単球 血液細胞数に及ぼす影響

時間 (時)	単球 平均+/-SE (細胞/ μ 血液)		
	G-CSF ^a	Neupogen ^b	G-CSF-IgG1-Fe ^c
0	622 +/- 255	675 +/- 163	804 +/- 208
4	1,837 +/- 60	1,320 +/- 215	1,364 +/- 296
8	1,519 +/- 168	1,044 +/- 79	1,025 +/- 234
12	1,166 +/- 51	1,482 +/- 315	999 +/- 273
24	1,283 +/- 140	1,092 +/- 5	1,463 +/- 145
48	638 +/- 68	825 +/- 147	3,167 +/- 111
72	820 +/- 293	1,079 +/- 80	2,416 +/- 323
96	893 +/- 363	1,175 +/- 147	1,118 +/- 37
120	786 +/- 56	557 +/- 64	1,208 +/- 294

a Bolder BioTechnology, Inc.で製造された野生型G-CSF

血漿G-CSFおよびG-CSF-IgGタンパク質の濃度は、商業的に入手可能なG-CSF ELISAキット(アル・アンド・ディー・システムズ社(R&D Systems, Inc.))を用いて定量することができる。滴定実験は、野生型G-CSFおよびG-CSF-IgG融合タンパク質を検出するためのELISAの相対的感度を測定するために行うことができる。類似の研究は

、タンパク質の投与の皮下経路を用いて行われうる。

【0110】

C. 2. 正常なマウスにおけるG-CSF-IgG融合タンパク質の効力

正常なマウスにおける効力を示すために、5匹の群（それぞれ～20gの体重）は、5日間まで、特定の間隔で、G-CSF、Neupogen、G-CSF-IgG融合タンパク質またはプラセボ（ベヒクル溶液）の皮下注射を受けることができる。ICRマウスのような正常なマウスは、ジャクソン・ラブラトリー社（Jackson Laboratories）、チャールズリバー社（Charles River）またはハーランド・スプレーグ・ダウレイ社（Harland Sprague Dawley）のような商業的販売者から購入することができる。6日目に、動物を屠殺し、そして血液試料を、全血細胞数（CBC）分析のために収集した。造血組織（肝臓および脾臓）が収集され、秤量され、そして増加した顆粒球形成の証拠を求める組織病理学的分析のためにホルマリンで固定される。骨髓は、顆粒球生成が増加した証拠を求めるために、種々の長骨、そして単位粒子調製および組織病理学的分析については胸骨から取り出すことができる。群の間の比較は、単独比較についてはスチューデントT検定を、そして多重比較については差異の一方分析を利用できる。 $P < 0.05$ は、有意であると考えられることができる。G-CSF-IgG融合タンパク質は、ベヒクル処理マウスに比較して、マウスにおいて循環している好中球レベルおよび顆粒球形成におけるより高い増大を刺激できる。G-CSF-IgG融合タンパク質の効力は、1日目に1回、1～5日目当たり1回、1、3および5日目に1日おきに、または1および4日目に3日毎に投与されるときに試験されうる。当初の実験では、異なる群のマウス（それぞれ～20gの体重）は、G-CSF-IgG融合タンパク質の注射当たり0.008～20 μ gの皮下注射を受けることができる。対照マウスは、ベヒクル溶液のみを受けうる。さらなる対照群は、G-CSF-IgG融合タンパク質と同じ投与計画を用いて、野生型G-CSFまたはNeupogen（2 μ g/5日間毎日）および2 μ gの野生型G-CSFを受けることができる。

【0111】

r G-C S F の毎日の注射は、マウスにおいて循環している好中球および顆粒球形成における増大を刺激しうのに対して、r G-C S F の同じ用量の頻度の低い投与では、刺激できないか、または少ない範囲まで刺激する。これらのパラメーターでの用量依存性の増加は、G-C S F-I g G-F c 処置動物で観察することができる。これらのパラメーターにおける大きな増加は、頻度の少ない投与スケジュールを用いた r G-C S F で処置された動物でより G-C S F-I g G1-F c 処置動物で観察することができる。明らかに少ない G-C S F-I g G1-F c は、r G-C S F の毎日の注射で得られるこれらのパラメーターにおける同じ増加を示しうる。

【0112】

3. 好中球減少症のマウスにおける G-C S F-I g G 融合タンパク質の効力 : G-C S F-I g G1-F c の効力も、好中球減少症の動物で示されることができる。好中球減少症は、シクロホスファミド (C P A ; 100mg/kg) での処置によって誘導され得て、それは、骨髄抑制性であり、そしてヒト臨床設定に等しい一般に使用される化学療法剤である。G-C S F は、シクロホスファミド処置動物における正常な好中球レベルの回復を促進する (Kubota ら、1990 ; Kang ら、1995)。マウス (~20g) は、0日目にシクロホスファミドの腹腔内注射を受けて、好中球減少症を誘導することができる。動物は、各々、様々な群の5匹の動物に分割でき、そして C P A 処置後の5日間までの間、G-C S F、G-C S F-I g G1-F c またはプラセボの皮下注射を受ける。1つの対照群は、シクロホスファミドを受けることができないが、プラセボ注射を受けることができる。使用されるべき正確な投与スケジュールは、上に記載される薬物動態学的実験および正常なマウス効力研究の結果によって測定することができる。実験は、5日間にわたって、毎日、1日おき、または3日毎の投与スケジュールを用いて行われうる。試験されるべき G-C S F-I g G1-F c の用量は、0.008~20 μ g/注射でありうる。6日目に、動物を屠殺し、そして血液および組織試料を、上に記載されるとおり分析できる。あるいは、群当たり5匹のマウスを、0~10日目に屠殺し、そして血液および組織試料を、上記の正常なマウスの実験について記載されるとおりに分析しうる。G-C S

F-IgG融合タンパク質は、ベヒクルを注射したCPA注射対照群に比べて、マウスでの循環中の好中球レベルおよび顆粒形成における促進された増加を刺激できる。

【0113】

C. GH-IgG融合タンパク質の効力

GH-IgG融合タンパク質のインビボ効力は、下垂体切除 (HYPOX) ラットで試験することができる。これは、GH欠乏の十分に特徴付けられたモデルである (Coxら、1994; Clarkら、1996)。GHは、HYPOXラットにおける体重増加および骨および軟骨成長を刺激する (Coxら、1994; Clarkら、1996)。下垂体切除したスプレーグ・ダウレイのラットは、チャールズリバー社、マサチューセッツ州ウィルミントン所在 (Charles River, Wilmington, MA) のような商業供給者から購入される。一般に、ラットは、40および50日齢およびおよそ100~120gの体重で下垂体切除される。5~8匹ラットの群は、10日間の期間をかけて毎日測定された特定の間隔および体重増加で、rhGH、GH-IgGまたはブラセボ (ベヒクル溶液) の皮下注射を受けることができる。ラットは、給餌に関連した可能性のある変数を最小にするために1日の同じ時間に毎日秤量することができる。全体の体重増加に加えて、骨成長 (脛骨の骨端幅) を測定することができる。屠殺するときに、右および左の近傍の脛骨の骨端を取り出し、そしてホルマリンで固定することができる。固定した脛骨は、矢状面にある近傍末端で分断され、硝酸銀で染色され、そして強力な光に暴露することができる (Green spanら、1949)。軟骨の骨端板の幅は、マイクロメーターアイピースを具備した立体顕微鏡を用いて測定される。各骨端について10回の測定が行われ、そして左および右脛骨についての合わせた値についての平均±SEMを計算することができる。群の間の比較は、単独比較についてはスチューデントT検定を、そして多重比較についての差異の一方方向分析を利用できる。 $P < 0.05$ は、有意であると考えられる。

【0114】

GH-IgG融合タンパク質の効力は、毎日、1日おき、3日毎、4日毎にラ

ットにタンパク質を投与するか、または単回注射によって試験することができる。皮下注射により毎日2回(10 μ g/日)投与される5 μ gのhGHは、HYPOXラットモデルにおける強力な成長応答を示す(Coxら、1994; Clarkら、1996)。当初の実験で、様々の群のラットが、0.2~200 μ g/注射/ラットまでの範囲にあるGH-IgGの種々の用量の皮下注射を受けることができる。対照ラットは、ベヒクル溶液のみを受け得る。さらなる対照群は、GH-IgG融合タンパク質と同じ投与計画を使用して、rhGH(5 μ gのBID)および10 μ gのhGHを受けることができる。HYPOXラットに対するGH-IgG融合タンパク質の投与は、ベヒクル処置群に比べて、体重増加および脛骨の骨端幅成長における増大を生じうる。

【0115】

GH-IgG融合タンパク質の効力も、悪液質のげっ歯類モデルで試験することができる。デキサメタゾン(DEX)は、体重損失を誘導するためにラットに投与することができる。正常なスプレーグ・ダウレイのラット(200~225 g)は、毎日、デキサメタゾン(200 μ g/ラット; およそ1mg/kg)の皮下注射を受けることができる。この量のデキサメタゾンは、8日の期間にわたり、およそ5~6 gの損失を誘導しうる。ベヒクルまたは可変の用量のGH-IgGは、様々な異なる実験で、1回、毎日、1日おき、3日毎、4日毎にラットに投与されうる。異なる群のラットが、ラット1匹あたり0.2~400 μ gのGH-IgG融合タンパク質の皮下注射を受けることができる。さらなる対照は、DEXまたは注射を受けない群のラット、DEXおよびrhGH(5 μ g BIDまたは10 μ g SID)を受けるラットの群、およびDEXおよびrhGH(実験によって、毎日、1日おき、3日毎、4日毎に10 μ g、すなわち、GH-IgG融合タンパク質が投与される頻度)を受けるラットの群を誘導することができる。動物は、毎日秤量されうる。食糧および水の消費は、毎日、監視されうる。屠殺する時に、内臓が秤量されうる。統計学上の分析は、HYPOXラット研究について記載されるとおりに行われうる。GH-IgG融合タンパク質で処置した動物は、ベヒクル処置した動物より体重損失が少ない可能性がある。

【0116】

(実施例9)

I g G 融合タンパク質二量体のさらなる精製

増殖因子/サイトカイン-I g G 融合タンパク質についての最終精製模式図は、タンパク質混入物および凝集物を除去するアフィニティークロマトグラフィー、および融合タンパク質四量体、二量体および単量体の純粋製造を行うことに加えて別のカラムクロマトグラフィー工程を誘導することができた。I g G 融合タンパク質の純粋製造は、インビトロバイオアッセイにおけるそれらの特異的活性を改善することができる。ヒト治療剤として使用するために、実質的に融合タンパク質二量体を含まない増殖因子/サイトカイン-I g G 単量体の調製品、および実質的に融合タンパク質単量体を含まないI g G 融合タンパク質二量体の調製品を得ることが好ましいであろう。増殖因子/サイトカイン-I g G 二量体は、当業者に公知の多様なカラムクロマトグラフィー操作を使用して、I g G 融合タンパク質単量体から分離することができる。クロマトグラフィー操作は、凝集物および他の混入タンパク質からI g G 融合タンパク質を精製するために使用することもできる。このようなクロマトグラフィー操作の例は、イオン交換、サイズ排除、疎水性相互作用、逆相、金属キレート化、アフィニティークラム、レクチンアフィニティー、ヒドロキシアパタイトおよび固定化染料アフィニティークロマトグラフィーが挙げられる。当業者に公知の他の有用な分離操作としては、塩沈殿、溶媒沈殿/抽出およびポリエチレングリコール沈殿が挙げられる。精製タンパク質中の内毒素濃度は、それらが発熱物質でないことを保証する、商業的に利用可能なキットを用いて試験することができる。

【0117】

実施例4に記載されたEPO-I g G4-Fc直接融合体(pBBT273によってコードされた)を、実施例2に記載されるとおりプロテインAアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。精製タンパク質を、スーパーデックス200HR10/30カラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィーによってさらに精製した。緩衝液は、20mM NaPO₄ (pH7.0)、150mM NaClであった。カラム容積は、24mlであった。カラムを、0.5ml/分の流速で、1.5カラム容積の緩衝液で抽出させた。0.5mlの画分を収

集した。単独の主要タンパク質ピークが観察され、そしてそれは、204 kDaの見かけの分子量で溶出した。カラムは、シグマケミカル社 (Sigma Chemical Company) (カタログ番号MW-GF-200) から購入されたタンパク質標準を使用して対応させた。還元および非還元条件下でのSDS-PAGE分析は、主要なタンパク質ピークは、主に、ジスルフィド結合EPO-IgG4-Fc二量体 (少なくとも90%、およびおそらく、非還元SDS-PAGEにより>95%) から構成されることを示した。大きな分子量の混入物 (非還元SDS-PAGEにより、見かけの分子量>200 kDa) および低分子量の混入物 (非還元SDS-PAGEにより、見かけの分子量<50 kDa) は、このカラム工程によって主に取出された。

【0118】

同様の実験が、pBBT180によってコードされたEPO-IgG1-Fc融合タンパク質、pBBT174によってコードされたG-CSF-IgG1-Fc融合タンパク質、およびpBBT175によってコードされたG-CSF-IgG4-Fc融合タンパク質を用いて行われた。これらのタンパク質は、実施例2に記載されるようにプロテインAアフィニティークロマトグラフィーによって精製され、そしてその後、上記のようにサイズ排除クロマトグラフィーによって精製された。EPO-IgG1-Fc融合タンパク質は、219 kDaの見かけの分子量を示すサイズカラムから溶出され、そして主に、EPO-IgG1-Fc二量体 (非還元SDS-PAGEにより>95%) から構成された。G-CSF-IgG1-Fc融合タンパク質は、148 kDaの見かけの分子量で溶出され、そして主に、G-CSF-IgG1-Fc二量体 (非還元SDS-PAGEにより>95%) から構成された。G-CSF-IgG4-Fc融合タンパク質は、135 kDaの見かけの分子量で溶出され、そして主に、G-CSF-IgG4-Fc二量体 (少なくとも90%、そして非還元SDS-PAGEにより>95%) から構成された。大きな分子量混入物 (非還元SDS-PAGEにより、見かけの分子量>200 kDa) および低い分子量混入物 (非還元SDS-PAGEにより、見かけの分子量<50 kDa) が、このカラム工程によって取出された。

【0119】

(実施例10)

前述の実施例に記載される操作は、わずかな修飾を伴って、他のタンパク質と共にIgG融合体を作成するために使用することができる。ヒトでの治療用途を見出す他のIgG融合体タンパク質の例としては、インターフェロン α 、 β および γ 、IL-11、TPO、GM-CSF、幹細胞因子およびflt3リガンドを含めたGHスーパー遺伝子ファミリーの他の構成員のIgG融合体が挙げられる。これらのタンパク質をコードするDNAは、下に記載されとおりクローン化され、そして実施例1に記載される種々のIgGドメインに融合せられる。組換え融合タンパク質は、実施例2および9に記載されるとおり発現および精製することができる。精製融合タンパク質は、それらの特異的活性を測定する適切なインビトロバイオアッセイで試験せられる。これらのタンパク質についてのDNA配列、アミノ酸配列および適切なインビトロおよびインビボバイオアッセイは公知であり、AggarwalおよびGuttermann (1992; 1996)、Aggarwal (1998)、およびSilvennoimemおよびHille (1996)に記載される。これらのタンパク質についてのバイオアッセイも、アール・アンド・ディー・システムズ社(R&D Systems, Inc.)、エンドジェン社(Endogen, Inc.)およびギブコ・ビーアールエル(Gibco BRL)のようなこれらのタンパク質の商業的供給者のカタログで供給される。

【0120】

1. ヒト α インターフェロンのクローニング。 α インターフェロンは、白血球によって生成され、そして抗ウイルス、抗腫瘍および免疫調節効果を示す。70%またはそれより大きなアミノ酸同一性を共有するタンパク質をコードする少なくとも20の固有の α インターフェロン遺伝子がある。既知の α インターフェロン種のアミノ酸配列は、Blattら、1996に示される。最も一般的なアミノ酸を、ポリペプチド一本鎖に組込む「コンセンサス」インターフェロンが、記載された(Blattら、1996)。ハイブリッド α インターフェロンタンパク質は、 α インターフェロンタンパク質の様々な部分を、単独タンパク質に分割

することによって生成されうる (Horisberger および Di Marco, 1995)。以下の実施例は、 $\alpha 2$ インターフェロン IgG 融合タンパク質の構築を記載する。同様の操作が、他の α インターフェロンタンパク質の IgG 融合体を作成するために使用することができる。

【0121】

DNAコードヒト α インターフェロン (IFN- $\alpha 2$) を、ヒトのゲノムの DNA (クロンテック (CLONTECH)) から PCR によって増幅した。PCR 反応を、BB93 (5>CGCGAATTCTGGATATGTAAATAGATACACAGTG>3 配列番号44) および BB94 (5>CGCAAGCTTAAAGATTATAATCGTGTTCATGGT>3 配列番号45) で行った。BB93は、IFN- $\alpha 2$ コード配列の~300bp 上流 (すなわち、5') のゲノム配列にアニールし、そしてクローニング目的の EcoRI 部位を含有する。BB94は、IFN- $\alpha 2$ コード配列の~100bp 下流 (すなわち、3') のゲノム配列にアニールし、そしてクローニング目的の HindIII 部位を含有する。PCR 反応は、33 μ l 反応中の 1 \times PCR 反応緩衝液 (プロメガコープ社、ウイスコンシン州マディソン所在 (Promega Corp., Madison WI)、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTP、0.2 μ M の各オリゴヌクレオチドプライマー、0.33 μ g のゲノムDNA および 0.4 単位の Taq ポリメラーゼ (プロメガ (Promega)) を使用した。反応は、3分間、96℃、続いて [95℃で60秒間、58℃で75秒間、72℃で90秒間] の35回サイクル、続いて試料を6℃に冷却することから構成された。反応は、「ロボサイクラー」熱循環装置 (ストラタジーン社、カリフォルニア州サンディエゴ所在 (Stratagene Inc., San Diego, CA)) で行われた。得られた~1kb PCR 産物を、EcoRI および HindIII で消化させ、そして同様に消化し、そしてアルカリホスファターゼ処理した pCDNA3.1 (+) (インビトロジェン社、カリフォルニア州サンディエゴ所在 (Invitrogen, San Diego, CA)) にクローニングした。IFN- $\alpha 2$ についての修正 DNA 配列を有するクローン (Hencoら、1985) が同定され、そして pBBT160 と称された。

【0122】

IgGコード配列とのIFN- α 2の遺伝子融合体を構築および発現するために、IFN- α 2遺伝子を、PCRに基く突然変異誘発を用いて、5'および3'末端で修飾した。pBBT160プラスミドDNAは、順方向プライマーBB108 (5' CGCAAGCTTGCCACCATGGCCTTGACCTTGCTTTA-3') および逆方向プライマーBB109 (5' -CGCGGATCCTCCGGATTCTTACTTCTTAACTTTTC-3') を有するPCRのための鋳型として使用された。プライマーBB108は、IFN- α 2分泌シグナルについてのコード配列の5'にアニールし、そして逆方向プライマーBB109は、IFN- α 2の3'末端にアニールする。得られたPCR産物は、HindIIIおよびBamHIで消化させ、ゲル精製し、そしてHindIIIおよびBamHIで消化され、アルカリホスファターゼ処理し、そしてゲル精製されたpCDNA3.1 (+)ベクターに入れてクローニングした。修正DNA配列を有するクローン (Hencora, 1985) は、pCDNA3.1 (+) : : IFNfusまたはpBBT190と称した。

【0123】

2. ヒト β インターフェロンのクローニング。

β インターフェロンは、線維芽細胞によって生成され、そして抗ウイルス、抗腫瘍および免疫調節効果を示す。 β インターフェロンは、単独遺伝子の産物である。DNAコードヒトの β インターフェロン (IFN- β) を、ヒトゲノムDNA (クロンテック (CLONTECH) から得られるPCRによって増幅させた。PCR反応は、順方向プライマーBB110 (5' CGCAAGCTTGCCACCATGACCAACAAGTGTCTCCTC-3') (配列番号48) および逆方向プライマーBB111 (5' -CGCGGATCCTCCGGAGTTTCGGAGGTAACCTGTAAG-3') (配列番号49) を用いて行われた。プライマーBB110は、IFN- β 分泌シグナルについてのコード配列の5'末端にアニールし、そして逆方向プライマーBB111は、IFN- β コード配列の3'末端にアニールする。得られたPCR産物は、HindIIIおよびBamHIで消化され、ゲル精製し、そしてHindIIIおよびBa

mH I で消化し、アルカリホスファターゼ処理し、そしてゲル精製した pCDN A 3. 1 (+) ベクターに入れてクローニングした。修正DNA配列を有するクローン (Derynckら、1980) は、pCDNA3. 1 (+) : : IFN Bfus または pBBT191 と称した。

【0124】

3. ヒト γ インターフェロンクローニング。

γ インターフェロンは、活性化T細胞によって生成され、そして抗ウイルス、抗腫瘍および免疫調節効果を示す。ヒト γ インターフェロンをコードする cDNA (IFN- γ) は、ヒトジャルカット (Jarkat) T細胞株 (アメリカンタイプカルチャーコレクション、メリーランド州ロックビル所在 (American Type Culture Collection, Rockville, MD)) から入手できる) から単離された総RNAからPCRによって増幅された。その細胞を、10% FBS、50単位/ml ペニシリンおよび $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシンを添加したRPM1培地で成長させた。RNA単離 (Weissら、1984; Wiskocilら、1985) の前にIFN- γ 発現を誘導するために、6時間、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ PHA-L (シグマケミカル社 (Sigma chemical Company)、カタログ番号L-4144) および $50 \text{ ng}/\text{ml}$ PMA (ホルボル12-ミリステート13-アセテート、シグマケミカル社、カタログ番号P-1585) を用いて、細胞を、インビトロで活性化させた。RNAは、製造業者の指示に従って、キアゲン社、カリフォルニア州サンタクラリタ所在 (Qiagen, Inc., Santa Clarita, CA) から購入したRNイーザーミニRNA単離キットを用いて細胞から単離された。およそ $104 \mu\text{g}$ の総RNAを、 2.4×10^7 細胞から単離した。一本鎖cDNAの第一鎖合成を、ペーリンガーマンハイム社、インディアナ州インディアナポリス所在 (Boehringer Mannheim Corp, Indianapolis, IN) からのRT-PCR (AMV) 用の第一鎖cDNA合成キットを使用して達成し、プライマーとしてランダムヘキサマーを使用した。鋳型として第一鎖合成の産物を用いたその後のPCR反応は、順方向プライマーBB112 (5' -CGCAAGCTTGCCACCATGAAA

TATACAAGTTATATC-3') (配列番号50) および逆方向プライマーBB113 (5'-CGCGGATCCTCCGGACTGGGATGCTCTTCGACCTTG-3') (配列番号51) を用いて行われた。プライマーBB112は、INF- γ 分泌シグナルについてのコード配列の5' 末端にアニールし、そして逆方向プライマーBB113は、INF- γ コード配列の3' 末端にアニールする。得られたPCR産物は、HindIIIおよびBamHIで消化され、ゲル精製し、そしてHindIIIおよびBamHIで消化し、アルカリホスファターゼ処理し、そしてゲル精製したpCDNA3.1 (+) ベクターに入れてクローニングした。修正DNA配列を有するクローン (Grayら、1982) は、pCDNA3.1 (+) : : IFNGfusまたはpBBT192と称した。

【0125】

4. インターフェロン-IgG融合体の構築。

IgG1-Fcコード配列は、INF- α 2、INF- β 、およびINF- γ のカルボキシ末端に融合された。~790bp BamHI-XbaI断片を、プラスミドpBBT167 [上記実施例1に記載された] から切除し、そしてBamHIおよびXbaIで消化し、アルカリホスファターゼで処理したpBBT190、pBBT191およびpBBT192に入れてクローニングした。同様に、IgG4-Fcコード配列も、INF- α 2、INF- β 、およびINF- γ に融合された。プラスミドpBBT158の~790bp BamHI-XbaI断片 [上記実施例1に記載] を、切断し、ゲル精製し、そしてBamHIおよびXbaIで消化し、アルカリホスファターゼで処理したpBBT190、pBBT191およびpBBT192に入れてクローニングした。IgG1-C μ コード配列は、INF- α 2、INF- β 、およびINF- γ のカルボキシ末端に融合させた。プラスミドpBBT166 [上記実施例1に記載] の~1080bp BamHI-XbaI断片を切断し、BamHIおよびXbaIで消化し、アルカリホスファターゼで処理したpBBT190、pBBT191およびpBBT192にクローニングした。得られた組換えプラスミドの構造は、制限エンドヌクレアーゼ消化およびアガロースゲル電気泳動によって確認された。それらがコ

ードするこれらのプラスミドおよびIFN- γ IgG融合タンパク質は、表8に列記される。

【0126】

【表9】

表8 インターフェロン- γ IgG融合タンパク質

発現プラスミド	IFN- γ 融合タンパク質
pBBT193	IFN- α 2-IgG1-Fc
pBBT194	IFN- α 2-IgG4-Fc
pBBT220	IFN- α 2-IgG1-C _H
pBBT195	IFN- β -IgG1-Fc
pBBT196	IFN- β -IgG4-Fc
pBBT221	IFN- β -IgG1-C _H
pBBT209	IFN- γ -IgG1-Fc
pBBT210	IFN- γ -IgG4-Fc
pBBT222	IFN- γ -IgG1-C _H

5. インターフェロン- γ IgG融合タンパク質の生物活性

5. A. インビトロ生物活性

インターフェロンについてのインビトロ生物学的アッセイとしては、抗ウイルスアッセイおよび細胞増殖阻害アッセイが挙げられる。ヒトダウジ細胞株（アメリカンタイプカルチャーコレクション、メリーランド州ロックビル所在（American Type Culture Collection, Rockville, MD））の増殖は、 α 、 β 、および γ インターフェロンによって阻害され、そしてこれらのタンパク質をアッセイするために使用される（Horoszewiczら、1979；EvingerおよびPestka、1981）。ダウジ細胞は、10% FBS、50単位/ml ペニシリンおよび50 μ g/ml ストレプトマイシンを補足したRPMI 1640培地で維持される。パイオアッセイは、96穴プレートに各ウェルに添加された細胞の数が、5~20 $\times 10^3$ 個でありうることを、およびプレートが、3~4日間、37℃でインキュベートされる以外は上に記載される操作を用いて、この培地で行われる。ダウジ細胞は、

インターフェロンの最適な効率についてのアッセイで使用する前に、早期飽和密度 ($1 \sim 2 \times 10^6$ 個/ml) にある可能性がある。組換え α 、 β および γ インターフェロンの連続希釈 (エンドジェン (Endogen) ; ギブコ・ビーアールエル (Gibco BRL) 、ユーエスバイオリジカル (US Biological)) は、平行に分析することができる。組換え α インターフェロンは、およそ $5 \sim 30$ pg/ml の IC₅₀ (50%まで増殖を阻害するために必要とするタンパク質の濃度) を示す。

【0127】

α 、 β および γ インターフェロンの生物活性も、細菌ブランク阻害アッセイを用いて測定することができる。これらのアッセイは、細胞をウイルス感染から保護するインターフェロンタンパク質の能力を測定する。これらのアッセイを行う方法は、Ozesら (1992) および Lewis (1987; 1995) に記載される。ヒトHeLaまたはWISH細胞 (アメリカンタイプカルチャーコレクションから入手可能である) は、96穴プレート (3×10^4 細胞/ウエル) 中で培養し、そして37℃でほぼコンフレンシーに成長することができる。細胞を、洗浄し、そして24時間、一連の2～3倍希釈の各IFN- γ 融合タンパク質調製物で処理した。その後、小疱性口内炎ウイルス (VSV) または脳心筋炎ウイルス (EMCV) は、0.1の多数の感染で添加でき、そしてそのプレートを、37℃で、さらに24～48時間、インキュベートした。さらなる対照としては、ウイルスなしの試料を挙げることができる。90%またはそれ以上の細胞が、ウイルス処理された、IFNなしの対照ウエル中で死滅させた (ウエルの目視観察によって測定された) 場合、細胞単層を、クリスタルバイオレット (20%メタノール中の0.5%) で染色することができ、そしてウエルの吸光度は、マイクロプレート読取り装置を用いて読取ることができる。あるいは、20 μ l のMTS/PMS混合物 (セルタイター96アクエアスワン溶液、プロメガス社、ウイスコンシン州マディソン所在 (Promega Corporation, Madison WI)) は、細胞単層に添加され、そして実施例3に記載されるとおり1～4時間後、ウエルの吸光度を490nmで読取ることができる。

。EC₅₀値（ウイルスの細胞変性効果を50%阻害するために必要とされるタンパク質の量）は、融合タンパク質および非融合野生型タンパク質の相対的効力を比較するために使用することができる。野生型IFNタンパク質は、細胞を、VSVおよびEMCVの細胞変性効果から保護し、そしてIFN種に依存して、このアッセイでおよそ $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^8$ 単位/mgの特異的活性を示す（Oz esら、1992）。

【0128】

表8に列記されるIFN- α -IgGおよびIFN- β -IgG融合タンパク質は、COS細胞で発現され、そして実施例1および2に記載されるとおり精製された。非還元SDS-PAGE分析は、IFN- α -IgG1-FcおよびIFN- α -IgG1-C_H融合タンパク質が、優先的に、ジスルフィド結合二量体から構成されることを示した；しかし、少量（<10%）の単量体の融合タンパク質は、非還元SDS-PAGEによる試料の全てで観察された。IFN- α -IgG1-C_H融合タンパク質は、有意な量のジスルフィド結合凝集物をも含み、そしてそれはゲルに入ることができなかった。IFN- α -IgG4-Fc融合タンパク質は、優先的に二量体性でもあった；単量体は、IFN- α -IgG1-Fc試料中よりも、この試料中に存在した。IFN- β -IgG1-FcおよびIFN- β -IgG1-C_H融合タンパク質は、主に二量体性でもあって、少量の単量体性融合タンパク質が、各試料中に存在した。対照的に、精製IFN- β -IgG4-Fc融合タンパク質の大多数は、単量体性であった；残りは、二量体であった。有意な量のジスルフィド結合凝集物は、精製IFN- β -IgG融合タンパク質の全てに存在した。

【0129】

精製IFN- α -IgGおよびIFN- β -IgG融合タンパク質は、上記のダウジ細胞成長阻害アッセイを用いて検定された。IFN- α -IgGおよびIFN- β -IgG融合タンパク質の全ては、生物学的に活性であった。各タンパク質についてのIC₅₀値が計算され、そして表9に示される。対照組換えIFN- α およびIFN- β は、それぞれ、エンドジェン社、マサチューセッツ州ウォーバン所在（Endogen, Inc., Woburn, MA）およびユーエス

バイオロジカル社、マサチューセッツ州スワンズスコット所在 (US Biological, Swampscott, MA) から購入された。

【0130】

【表10】

表9 IFN- α -IgGおよびIFN- β -IgG融合タンパク質の生理活性

クローン	タンパク質	IC50範囲 (ng/ml) 1	平均IC50 (ng/ml)
-	rhIFN- α	0.015, 0.010	0.013
PBBT193	IFN- α 2-IgG1-Fc	1.8, 2.5	2.1
PBBT194	IFN- α 2-IgG4-Fc	2.5, 3.5	3.0
PBBT220	IFN- α 2-IgG1-C _H	3.5	3.5
-	rhIFN- β	0.18, 0.3	0.24
PBBT195	IFN- β -IgG1-Fc	175, 200	188
PBBT196	IFN- β -IgG4-Fc	15, 15	15
PBBT221	IFN- β -IgG1-C _H	90	90

1 個々のアッセイから得たデータ

IFN- γ -IgG融合タンパク質は、実施例2に記載されるとおり、COS細胞で発現され、そしてプロテインAアフィニティークロマトグラフィーで精製することができる。IFN- γ は、低pHに感受性があるので、融合タンパク質は、低pHを含まない溶出条件を用いたアフィニティークラムから溶出することができる。このような方法の1つは、ピアスケミカル社 (Pierce Chemical Company) (カタログ番号21013および21014) から入手できるジェントル (Gentle) Ag/Ab溶出緩衝液で γ インターフェロン-IgG融合タンパク質を溶出させ、続いて脱塩カラムでのタンパク質の脱塩をすることである。

【0131】

5. B. IFN- α -IgKCのインビトロ活性

実施例5に記載されるIFN- α -IgKC融合タンパク質をコードするプラスミドDNAを、COS細胞に形質移入させ、そして調節培地を、3日後に収集した。調節培地の一連の希釈は、ダウジ細胞成長阻害アッセイで試験された。融

合タンパク質の濃度を、エンドジェン社から購入したIFN- α 2ELISAキットを用いて測定した。調節培地は、ダウジ細胞の増殖を阻害した。IFN- α -IgKC融合体についてのIC₅₀値は、およそ20pg/ml(～0.69pM)であると推測された。対照非融合IFN- α タンパク質は、これらの実験で、6.5pg/ml(～0.33pM)のIC₅₀値を示すダウジ細胞増殖を阻害した。

【0132】

5. C. IFN-IgG融合タンパク質のインビボ活性

IFN- α 生物活性は、相対的に種特異的であり、そしてそれは、研究されうる臨床前動物モデルの範囲を制限する。インビボでのIFN- α -IgG融合タンパク質の効力を測定するために使用することができる1つのモデルは、無胸腺のヌードマウスにおけるヒト腫瘍異種移植片成長の阻害である。ヒトIFN- α 2は、マウス細胞で活性でなく、そしてヌードマウスにおけるヒト腫瘍異種移植片成長の阻害は、ヒト腫瘍細胞における直接抗増殖効果を通して起る。IFN- α 2は、無胸腺のマウスにおける多様な一次ヒト腫瘍異種移植片およびヒト腫瘍細胞株の成長を阻害する(Balkwillら、1985;Balkwill、1986;Johnsら、1992;LindnerおよびBorden、1997)。その研究についての一次終点は、処置マウスにおける腫瘍容積でありうる。IFN- α -IgG融合タンパク質の投与は、ベヒクル処置動物に対して、マウスにおける腫瘍成長(腫瘍容積によって測定される)を阻害する。無胸腺のヌードマウスは、チャールズリバー社のような商業的販売者から購入されうる。各マウスに、0日目に、 2×10^6 NIH-OVCAR-3またはMCF-7腫瘍細胞(これらの細胞株は、アメリカンタイプカルチャーコレクションから入手できる)を注射でき、そして試験群に無作為に付与され、各々10匹のマウスから構成されうる。別のIFN- α 応答性腫瘍型から得られる適切な数の細胞は、NIH-OVCAR-3またはMCF-7細胞に置換されうる。腫瘍容積は、LindnerおよびBorden(1997)によって記載されるとおり、カリパスを用いて腫瘍の長さおよび幅を測定することによって、4日の間隔で測定することができる。屠殺のときに、腫瘍を切断し、そして秤量できる。各試験群につ

いての平均腫瘍容積±SEMは、各試料の採取点について計算することができる。群の間の比較は、単独比較についてはスチューデントT検定を、そして多重比較については差異の一方向分析を利用することができる。皮下注射により1日当たり1回投与される $5\mu\text{g}$ のIFN- α 2は、6週後に無胸腺のマウスにおけるNIH-OVCAR-3細胞およびMCF-7細胞の成長を80%阻害する(LinderおよびBorden, 1997)。いずれかの細胞株は、これらの研究のために使用することができる。NIH-OVCAR-3株(ATCCから入手可能である)は、MCF-7細胞がそうであるように、成長のためにエストロゲンを必要としない。MCF-7細胞を用いた異種移植片実験は、マウスが、卵巣切除され、そしてエストロゲンペレットを移植されることが必要である(LinderおよびBorden, 1997)。当初の実験で、異なる群のマウスは、毎日、1日おき、または3日毎の投与スケジュールを用いて、注射当たり1または $5\mu\text{g}$ のrIFN- α 2、または注射当たり0.1~100 μg のIFN- α 1 IgG融合タンパク質の皮下注射を受けることができる。投与は、マウスへの腫瘍細胞の注射に続いて2日目に始まることができる。対照マウスは、ベヒクル溶液のみを受けることができる。1日おきおよび3日毎の投与実験で、さらなる正の対照群は、毎日、 $5\mu\text{g}$ のrIFN- α 2の皮下注射を受けることができる。

【0133】

IFN- β -IgG融合タンパク質のインビボ効力は、類似の用量および投与スケジュールを用いて、同じ腫瘍異種移植片モデルで示されることができる。

6. IL-11-IgG融合タンパク質

6. A. IL-11のクローニング。IL-11は、血小板の巨核球前駆体の発達を刺激する。ヒトIL-11をコードするcDNAは、ヒト膀胱癌細胞株5637並びにHL60およびU937白血病細胞株(アメリカンタイプカルチャーコレクションから入手可能)のようなIL-11を発現するヒト細胞株から単離されたRNAからPCRによって増幅されることができる。PCR反応は、順方向プライマーIL-11F (5'-CGCAAGCTTGCCACCATGA ACTGTTTGCCGCTG-3') (配列番号52) および逆方向プライ

マーIL-11R (5' -CGCGGATCCTCCGGACAGCCGAGTCTTCAGCAGCAG-3') (配列番号53) を用いて行われうる。プライマーIL-11Fは、IL-11分泌シグナルについてのコード配列の5' 末端にアニールし、そして逆方向プライマーIL-11Rは、IL-11コード配列の3' 末端にアニールする。得られたPCR産物は、HindIIIおよびBamHIで消化し、ゲル精製し、そしてHindIIIおよびBamHIで消化し、アルカリホスファターゼ処理し、ゲル精製したpCDNA3.1 (+) ベクターに入れてクローニングすることができる。数種のクローンは、修正DNA配列であるものを同定するために配列決定することができる。

【0134】

あるいは、IL-11コード配列は、上記実施例1、セクションC4に記載されるように、およびHortonら(1993)による「重複延長」の技術によって、その後、連続して一緒に分断して、全長クローンを生じる2つのセグメントのように、PCRによって増幅された。アミノ酸1~147をコードする1つのセグメントは、上記セクション2Bで詳述されるとおり、ヒト膀胱癌細胞株5637から抽出された総RNAから由来する一本鎖cDNAからPCRによって増幅された。鋳型として第一鎖合成の産物を用いたPCR反応は、順方向プライマーBB265 (5' >CGCAAGCTTGCCACCATGAAGTGTGTTGCCGCTG>3') (配列番号54) および逆方向プライマーBB273 (5' >GCGGGACATCAGGAGCTGCAGCCGGCGCAG>3') (配列番号55) を用いて行うことができる。プライマーBB265は、IL-11分泌シグナル配列についてのコード配列の5' 末端にアニールし、そして逆方向プライマーBB273は、アミノ酸138~147をコードする配列にアニールし、そしてエキソン4および5のアニールを埋める(McKinleyら、1992)。この反応の~450pb産物を、ゲル精製し、そして連続分断反応で使用した。アミノ酸142~197をコードするDNA配列を含む第二セグメントは、ヒトゲノムDNA (ストラタジーン (STRATAGENE)) からPCRにより増幅された。鋳型としてヒトゲノムDNAを用いたPCR反応は、順方向プライマーBB272 (5' >CAGCTCCTGATGTCCCGCCT

GGCCCTG>3) (配列番号56) および逆方向プライマーBB274 (5>AGTCTTCAGCAGCAGCAGTCCCCTCAC>3) (配列番号57) を用いて行われた。BB272は、アミノ酸142~150をコードする配列にアニールし、そしてエキソン4および5の連結を埋める。BB274は、アミノ酸189~197をコードする配列にアニールする。この反応の~170 pb産物を、ゲル精製し、そして連続分断反応に使用した。

【0135】

ゲル精製した~450 bp および~170 bp産物は、鋳型として~450 bp および~170 bp産物、並びに順方向プライマーBB265 (上記) および逆方向プライマーBB275 (5>CGCGGATCCTCC GGACAGC CGAGTCTTCAGCAGCAG>3) (配列番号58) を含むPCR反応と一緒に分断された。BB275は、アミノ酸191~199をコードするDNA配列にアニールする。この反応の~620 bp産物を、ゲル精製し、HindIII およびBamHIで消化し、そしてHindIII およびBamHIで消化し、アルカリホスファターゼ処理し、ゲル精製したpCDNA3.1 (+)ベクターに入れてクローニングした。修正DNA配列を有するクローンは、pCDNA3.1 (+) : IL-11fusまたはpBBT298と称した。

【0136】

6. B. IL-11-IgG融合体の構築。

IgG1-Fcコード配列を、IL-11のカルボキシ末端に融合させた。~790 bp BamHI-XbaI断片を、プラスミドpBBT174 [上記実施例2に記載、表1参照] から切断し、そしてBamHIおよびXbaIで消化しアルカリホスファターゼで処理したpBBT298に入れてクローニングした。そして同様に、IgG4-Fcコード配列も、IL-11のカルボキシ末端に融合させた。プラスミドpBBT175の~790 bp BamHI-XbaI断片 [上記実施例2に記載、表1参照] を切断し、ゲル精製し、そしてBamHIおよびXbaIで消化し、アルカリホスファターゼで処理したpBBT298に入れてクローニングした。IgG1-C_HおよびIgG4-C_Hコード配列も、IL-11のカルボキシ末端に融合させた。IgG1-C_HおよびIgG4-C_Hコー

ド配列を、それぞれプラスミドpBBT173およびpBBT184 [上記実施例2に記載、表1参照] から得られる～1080pb BamHI-XbaI断片として切断し、そしてBamHIおよびXbaIで消化したpBBT298にクローニングし、アルカリホスファターゼで処理した。得られた組換えプラスミド全ての構造は、制限エンドヌクレアーゼ消化およびアガロースゲル電気泳動によって確認された。それらがコードするこれらのプラスミドおよびIL-11-IgG融合タンパク質は、表10に列記される。

【0137】

【表11】

表10 IL-11-IgG融合タンパク質

プラスミド	IL-11-IgG融合タンパク質
pBBT336	IL-11-IgG1-Fc
pBBT337	IL-11-IgG4-Fc
pBBT338	IL-11-IgG1-C _N
pBBT339	IL-11-IgG4-C _N

IL-11-IgG1-Fc直接融合体は、DNA鋳型としてプラスミドpBBT336を用いたPCRによって作成することができる。1つのPCR反応は、オリゴIL11DFA (5' CTGAAGACTCGGCTGGA GCCCAAATCTTGTGACAAA-3') (配列番号59) およびBB82を使用できる。二次PCR反応は、オリゴIL11DFB (5' ACAAGATTTGGGCTCCAGCCGAGTCTTCAGCAGCAG-3') (配列番号60) およびBB272を使用できる。これらのPCR反応から得られる産物を、ゲル精製し、混合し、そしてオリゴBB82およびBB272を用いた三次PCR反応に付すことができる。およそ800bp PCR産物を、ゲル精製し、SgrAI IIIおよびSacIIで消化し、そして仔ウシ腸のホスファターゼで処理した、同様に切断したpBBT336にクローニングした。修正挿入物を有するクローンは、DNA配列決定によって同定することができる。

【0138】

IL11-IgG4-Fc直接融合体は、DNA鋳型としてプラスミドpBBT337を用いたPCRによって作成することができる。1つのPCR反応は、

オリゴIL11DFC (5'-CTGAAGACTCGGCTGGAGTCC A AATATGGTCCCCCA-3') (配列番号61) およびBB82を使用できる。二次PCR反応は、オリゴIL11DFD (5'-ACCATATTTGGACTCCAGCCGAGTCTTCAGCAGCAG-3') (配列番号62) およびBB272を使用できる。これらのPCR反応から得られる産物を、ゲル精製し、混合し、そしてオリゴBB82およびBB272を用いた三次PCR反応に付することができる。およそ800bp PCR産物を、ゲル精製し、SgrAIおよびSacIIで消化し、そして仔ウシ腸のホスファターゼで処理した、同様に切断したpBBT337にクローニングした。修正挿入物を有するクローンは、DNA配列決定によって同定することができる。

【0139】

B9-11細胞株(Luら、1994)、T11細胞株(アール・アンド・デュー・システムズ)または別のIL-11-依存性細胞株は、IL-11-IgG融合タンパク質の生物活性を測定するために使用することができる。IL-11-依存性細胞株は、数日から数ヶ月の間、10% FBS、50単位/ml ペニシリンおよび50 μ g/ml ストレプトマイシンおよび50~100 ng/ml のIL-11を含有するRPMI 1640培地中のB9細胞株(ジャーマンコレクション・オブ・マイクロオーガニズムズ・アンド・セルカルチャーズ、ドイツ国ブラウンシュweig所在(the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany)から入手可能)を培養し、続いて個々の株について選択する細胞の希釈クローニングを制限することによって作成することができる。

【0140】

6. C. IL-11-IgG融合タンパク質のインビオ効力

IL-11-IgG融合タンパク質は、hIL-11およびhTPOについて見られるもの(Lokら、1994; Kaushanskyら、1994; Nebenら、1993; Yonemuraら、1993)と同様に、正常なマウスまたはラットでの循環中の血小板および巨核球における増加を刺激する。IL-

IL-11-Ig融合タンパク質の効力は、1日おき、3日毎、または単回注射の投与スケジュールを用いた正常な動物で試験することができる。IL-11-Ig融合タンパク質の有効性は、1日おき、3日毎または単回注射の投与スケジュールを用いて、げっ歯類化学療法で誘導された血小板減少症モデルでも示すことができる(Hangocら、1993;Leonardら、1994)。

【0141】

マウスまたはラットの群は、7日までの間、特定の間隔(毎日、1日おき、3日毎)で、rhIL-11、IL-11-Ig融合タンパク質またはプラセボ(ベヒクル溶液)の皮下注射を受けることができる。広範囲のIL-11-Ig融合タンパク質の用量は、用量の内の1つが効果がある見込みを増大するこれらの当初の実験で試験することができる。試験されるべきIL-11-Ig融合タンパク質の用量範囲は、これらの動物モデルについて先に測定されたIL-11の最適用量の0.002Xから25Xまでの範囲に及ぶ。多すぎる融合タンパク質の投与が、毒性のために巨核球形成を妨げることが可能である。対照動物は、ベヒクル溶液のみを受けることができる。さらなる対照群は、rhIL-11の皮下注射を毎日受けることができる。7日目に、動物を屠殺し、そして血液試料を、全血細胞数分析のために収集した。造血組織(肝臓および脾臓)を収集し、秤量し、そして増加した巨核球形成の証拠を求める組織病理学的分析のために、ホルマリンに固定することができる。骨髄は、巨核球生成が増加した証拠を求めるために、種々の長骨、そして単位粒子調製および組織病理学的分析については胸骨から取り出されることができる。群の間の比較は、単独比較についてはスチューデントT検定を、そして多重比較についての差異の一方分析を利用できる。P<0.05は、有意であると考えられる。IL-11-Ig融合タンパク質は、動物中の循環中の血小板および巨核球形成における増加を刺激する。

【0142】

7. TPO-Ig融合タンパク質

7. A. TPOのクローニング。トロンボポエチン(TPO)は、血小板の巨核球前駆体の発生を刺激する。ヒトTPOをコードするcDNAは、ヒト成人および胎児肝臓(クロンテック社(CLONTECH, Inc.))から製造され

る一本鎖cDNAからPCRによって増幅された。胎児または成人腎臓(クローンテック社)から製造された一本鎖cDNAも、TPOを増幅するために使用することができる。PCR反応は、順方向プライマーBB343(5'-CGCAAGCTTGCCACCATGGAGCTGACTGAATTGCTC-3') (配列番号63)および逆方向プライマーBB344(5'-CGCGGATCTCCGGACCTTCC TGAGACAGATTCTG-3') (配列番号64)を用いて行われた。プライマーBB343は、TPO分泌シグナルについてのコード配列の5'末端にアニールし、そして逆方向プライマーBB344は、TPOコード配列の3'末端にアニールする。

【0143】

TPOをコードする配列は、内部のBamHI部位を含有し、そしてこの部位は、2つのセグメントとして~1000bp TPOコード配列をクローニングするために使用された; ~400bpのアミノ末端HindIII-BamHI断片および~600bpのカルボキシ末端BamHI断片。これらの断片の各々は、最初にクローニングされ、そして配列決定し、そして続いて、内部のBamHI部位を通して一緒に連結されて、完全TPOコード配列を生成した。~1,000bp PCR産物は、HindIIIおよびBamHIで消化して、~400bpのHindIII-BamHI断片および~600bpのBamHI断片を生じた。これらの断片を、ゲル精製し、そしてそれぞれ、HindIIIおよびBamHI、またはBamHIのみで消化し、アルカリホスファターゼ処理し、ゲル精製したpCDNA3.1(+)ベクターに入れてクローニングした。各断片について修正DNA配列を有するクローン(Fosterら、1994; Sohmarら、1994)が同定された。その後、600bp BamHI断片を、配列が立証されたクローンから切断し、そしてBamHI切断物にクローニングし、アルカリホスファターゼ処理し、そして配列認証された400bp HindIII-BamHI断片を含有するpCDNA3.1(+)誘導体をゲル精製した。得られたクローンを、制限エンドヌクレアーゼ消化およびPCRによって分析して、適切な配向で、すなわち、TPOについてのコード配列が適切に再構築されるように600bp BamHI断片を担持するものを同定した。1つの適切

に配向されたクローンは、pCDNA3.1(+):TPOfus、またはpBBT355と称し、そしてさらなる構築のために使用された。

【0144】

7. B. TPO-IgG融合体の構築。TPOのカルボキシ末端へのIgGコード配列の融合は、TPOについてのコード配列がBamHI部位を含むので、制限エンドヌクレアーゼBspEIが、BamHIの代わりに使用される以外は、IL-11-IgG融合を構築するために使用されるものと類似の操作で構築された。実施例1、2および10に記載された構築物の全てでser-gly-gly-ser-gly-gly-ser (配列番号3) リンカーペプチドをコードするために使用される配列は、単独BspEI認識部位(TCCGGA)を含み、そしてこの部位は、pCDNA3.1(+)ベクターまたはIgG1-Fc、IgG4-Fc、IgG1-C_HおよびIgG4-C_Hコード配列内に生じない。

【0145】

IgG1-Fcコード配列は、TPOのカルボキシ末端に融合された。~790bp BspEI-XbaI断片を、プラスミドpBBT174 [上記実施例2に記載、表1参照] から切断し、そしてBspEIおよびXbaIで消化し、し、アルカリホスファターゼで処理したpBBT355に入れてクローニングした。同様に、IgG4-Fcコード配列も、TPOのカルボキシ末端に融合された。プラスミドpBBT175の~790bp BspEI-XbaI断片 [上記実施例2に記載、表1参照] を切断し、ゲル精製し、そしてBspEIおよびXbaIで消化し、そしてアルカリホスファターゼで処理されたpBBT355に入れてクローニングした。IgG1-C_HおよびIgG4-C_Hコード配列も、TPOのカルボキシ末端に融合された。IgG1-C_HおよびIgG4-C_Hコード配列を、それぞれ、プラスミドpBBT173およびpBBT184 [上記実施例2に記載、表1参照] から~1080bp BspEI-XbaI断片として切断し、そしてBspEIおよびXbaIで消化し、アルカリホスファターゼで処理したpBBT355に入れてクローニングした。得られた組換えプラスミド全ての構造は、制限エンドヌクレアーゼ消化およびアガロースゲル電気泳動に

よって立証された。表11は、これらのプラスミドおよびそれらがコードするTPO-IgG融合タンパク質を列記する。

【0146】

【表12】

表11 TPO-IgG融合タンパク質

発現プラスミド	TPO-IgG融合タンパク質
pBBT340	TPO-IgG1-Fc
pBBT341	TPO-IgG4-Fc
pBBT342	TPO-IgG1-C _H
pBBT343	TPO-IgG4-C _H

成熟TPOタンパク質のアミノ酸1～153から構成される、TPOのアミノ末端ドメインは、巨核球形成のために十分であると示された(Bartleyら、1994、de Sauvageら、1994)。このドメインは、pBBT355(上記)中のTPOコード配列からPCRによってサブクローニングされ、そして免疫グロブリン配列に融合された。PCR反応は、順方向プライマーBB343(上記)および逆方向プライマーTPO153rev(5'>CGC GGA TCC TCC GGA CCT GAC GCA GAG GGT GGA CCC>3)(配列番号65)を用いて行われるであろう。プライマーTPO153revは、アミノ酸147～153をコードするTPO配列にアニールし、そしてBamHI部位を含む柔軟性リンカーの一部を加える。この反応についての鋳型は、pBBT355DNAであろう。得られた～600bpのPCR産物は、BamHIで消化され、そして得られた～105bpBamHI断片は、ゲル精製され、pUC18でクローニングし、そして配列決定した。その後、修正配列を有するクローンは、それから～105bpBamHI断片がゲル精製されるプラスミドDNAの源として使用される。この断片は、pBBT340、pBBT341、pBBT342およびpBBT343(全て上記に記載されている)中に存在する～600bpBamHI断片を置換するために使用される。これは、ser-gly-gly-ser-gly-gly-serリンカーを介して、それぞれIgG1-Fc、IgG4-Fc、IgG1-C_HおよびIgG4-C_Hに融合されたTPOのアミノ酸1～153から構成される融合タン

バク質の構築を生じるであろう。

【0147】

TPO-IgG1-Fc直接融合体は、DNA鋳型としてプラスミドpBBT340を用いてPCRにより作成することができる。1つのPCR反応は、オリゴTPODFA (5' CTGTCTCAGGAAGGGGAG CCCAAATCTGTGACAAA-3') (配列番号66) およびBB82を使用できる。二次PCR反応は、オリゴTPODFB (5' ACAAGATTTGGGCTCCCCTTCCTGAGACAGATTCTG-3') (配列番号67) およびBB91を使用できる。これらのPCR反応から得た産物をゲル精製し、混合し、そしてオリゴBB82およびBB91を用いた三次PCR反応に付すことができる。およそ1700bp PCR産物を、ゲル精製し、HindIIIおよびSacIで消化し、そして仔ウシ腸のホスファターゼで処理した、同様に切断したpBBT340にクローニングした。修正挿入物を有するクローンは、DNA配列決定によって同定することができる。

【0148】

TPO-IgG4-Fc直接融合体は、DNA鋳型としてプラスミドpBBT341を用いてPCRにより作成することができる。1つのPCR反応は、オリゴTPODFC (5' CTGTCTCAGGAAGGGGAGTCCAAATATGGTCCCCCA-3') (配列番号68) およびBB82を使用できる。二次PCR反応は、オリゴTPODFD (5'-ACCATATTTGGACTCCCTTCCTGAGACAGATTCTG-3'、配列番号69) およびBB91を使用できる。これらのPCR反応から得た産物をゲル精製し、混合し、そしてオリゴBB82およびBB91を用いた三次PCR反応に付すことができる。およそ2000bp PCR産物を、ゲル精製し、HindIIIおよびSacIで消化し、そして仔ウシ腸のホスファターゼで処理した、同様に切断したpBBT341にクローニングした。修正挿入物を有するクローンは、DNA配列決定によって同定することができる。

【0149】

同様の方法は、IgG-Fcドメインに融合されたTPOのアミノ酸1~15

3のみをコードする類似の直接融合体を構築するために使用できるであろう。

細胞株M-07e (Avanziら、1988; ジャーマンコレクション・オブ・マイクロオーガニズムズ・アンド・セルカルチャーズ、ドイツ国ブラウンシュweig 所在 (the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany) から入手可能) を、TPO-IgG 融合タンパク質生物活性を測定するために使用できる。

【0150】

7. C. TPO-IgG 融合タンパク質のインビボ効力

TPO-IgG 融合タンパク質は、hIL-11 および hTPO について見られるものと類似して、正常なマウスまたはラットでの循環中の血小板および巨核球形成における増加を刺激する (Lokら、1994; Kaushanskyら、1994; Nebenら、1993; Yonemuraら、1993; Kaszubskaら、2000)。TPO-IgG 融合タンパク質の効力は、1日おき、3日毎、または単回注射の投与スケジュールを用いて、正常な動物で試験することができる。TPO-IgG 融合タンパク質の有効性は、1日おき、3日毎または単回注射の投与スケジュールを用いて、げっ歯類化学療法で誘導された血小板減少症モデルでも示されることができる (Hangocら、1993; Leonardら、1994)。

【0151】

マウスまたはラットの群は、7日までの間、特定の間隔 (毎日、1日おき、3日毎) で、rhTPO、TPO-IgG 融合タンパク質またはプラセボ (ベヒクル溶液) の皮下注射を受けることができる。広範囲のTPO-IgG 融合タンパク質の用量は、用量の内の1つが効果がある見込みを増大するこれらの当初の実験で使用することができる。試験されるべきTPO-IgG 融合タンパク質の用量範囲は、これらの動物モデルについて先に測定されたTPOの最適用量の0.002Xから25Xまでの範囲に及ぶことができる。多すぎる融合タンパク質の投与が、毒性のために巨核球形成を妨げることが可能である。対照動物は、ベヒクル溶液のみを受けうる。さらなる対照群は、rhTPOの皮下注射を毎日受け

うる。7日目に、動物を屠殺し、そして血液試料を、全血細胞数分析のために収集した。造血組織（肝臓および脾臓）を収集し、秤量し、そして増加した巨核球形成の証拠を求める組織病理学的分析のために、ホルマリンに固定することができる。骨髓は、巨核球生成が増加した証拠を求めるために、種々の長骨、そして単位粒子調製および組織病理学的分析については胸骨から取り出されることができる。群の間の比較は、単独比較についてはスチューデントT検定を、そして多重比較についての差異の一方分析を利用できる。 $P < 0.05$ は、有意であると考えられるであろう。TPO-Ig融合タンパク質は、動物中の循環中の血小板および巨核球形成における増加を刺激する。

【0152】

8. GM-CSF-IgG融合タンパク質

8. A. GM-CSFのクローニング。ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)をコードするcDNAは、上記セクション2. Bに詳述されるとおり、ヒト膀胱癌細胞株5637から調製される総RNAからPCRによって増幅された。鋳型として一次鎖合成の産物を用いたPCR産物は、順方向プライマーBB263 (5' > CGCAAGCTTGCCACCATGTGGCTGCAGAGC CTGCTG > 3') (配列番号70) および逆方向プライマーBB264 (5' > CGCGGATCCTCCGGACTCCTGGACTGGCT CCCAGCA > 3') (配列番号71) を用いて行われた。プライマーBB263は、GM-CSF分泌シグナルについてのコード配列の5' 末端にアニールし、そして逆方向プライマーBB264は、GM-CSFコード配列の3' 末端にアニールする。生じた~450bp PCR産物を、HindIIIおよびBamHIで消化し、そしてHindIIIおよびBamHIで消化し、アルカリホスファターゼ処理し、ゲル精製したpCDNA3. 1 (+) ベクターに入れてクローニングした。修正DNA配列を有するクローン (Cantrellら、1985) は、pCDNA3. 1 (+) : : GM-CSFfusまたはpBBT267と称した。

【0153】

あるいは、ヒトGM-CSFをコードするcDNAは、ヒトT細胞株HUT1

02 (アメリカンタイプカルチャーコレクションから入手可能) のようなGM-C SFを発現する細胞株から単離されたRNAから、またはヒト末梢血リンパ球または20 μ g/ml コンカナバリンA (シグマケミカル社) および40 ng/ml ホルボールミリステートアセテート (PMA, シグマケミカル社) で活性化されたヒトジラルカットT細胞株からPCRにより増幅することができる。PCR反応は、順方向プライマーBB263および逆方向プライマーBB264を用いて行うことができる。得られた~450 bpのPCR産物は、HindIIIおよびBamHIで消化され、そしてゲル精製し、そしてHindIIIおよびBamHIで消化し、アルカリホスファターゼ処理し、ゲル精製したpCDNA3.1 (+) ベクターに入れてクローニングした。数種のクローンは、修正DNA配列を用いて、あるものを同定するために配列決定することができる。

【0154】

8. B. GM-C SF-IgG (GF-IgG) 融合体の構築。IgG1-Fcコード配列を、GM-C SFのカルボキシ末端に融合することができる。プラスミドpBBT174から切断された~790 bp BamHI-XbaI断片 [上記実施例2に記載、表1参照] は、BamHIおよびXbaIで消化し、アルカリホスファターゼで処理したpBBT267に入れてクローニングすることができる。同様に、IgG4-Fcコード配列は、GM-C SFのカルボキシ末端にも融合されることができる。プラスミドpBBT175から切断された~790 bp BamHI-XbaI断片 [上記実施例2に記載、表1参照] は、BamHIおよびXbaIで消化し、アルカリホスファターゼで処理したpBBT267に入れてクローニングした。IgG1-C_HおよびIgG4-C_Hコード配列は、GM-C SFのカルボキシ末端にも融合させることができる。IgG1-C_HおよびIgG4-C_Hコード配列を、それぞれ、プラスミドpBBT173およびpBBT184 [上記実施例2に記載、表1参照] から~1080 bp BamHI-XbaI断片として切断し、そしてBamHIおよびXbaIで消化し、アルカリホスファターゼで処理したpBBT267に入れてクローニングできる。得られた組換えプラスミド全ての構造は、制限エンドヌクレアーゼ消化およびアガロースゲル電気泳動によって立証される。GM-C SF-IgG融合タンパ

ク質の生物活性は、TF-1細胞株（アメリカンタイプカルチャーコレクション（American Type Culture Collection）から入手可能）を用いて測定される。

【0155】

GM-CSF-IgG1-Fc直接融合体は、DNA鋳型としてプラスミドp cDNA3.1::GM-CSF-IgG1-Fcを使用してPCRによって作成することができる。1つのPCR反応は、オリゴGMCSFDFA（5' GAGCCAGTCCAGGAGGAGCCCAAATCTTGTGACAAA-3'）およびBB82を使用できる。二次PCR反応は、オリゴGMCSFDFB（5' ACAAGATTTGGGCTCCTCCTGGACTGGCTCCCA GCA-3'）およびBB91を使用できる。これらのPCR反応から得られる産物を、ゲル精製し、混合し、そしてオリゴBB82およびBB91を用いた三次PCR反応に付すことができる。およそ1150bp PCR産物を、ゲル精製し、HindIIIおよびSacIIで消化し、得られた~675bp HindIII/SacII断片をゲル精製し、そして仔ウシ腸のホスファターゼで処理した、同様に切断したp cDNA3.1::GM-CSF-IgG1-Fcにクローニングした。修正挿入物を有するクローンは、DNA配列決定によって同定することができる。

【0156】

GM-CSF-IgG4-Fc直接融合体は、DNA鋳型としてプラスミドp cDNA3.1::GM-CSF-IgG4-Fcを使用してPCRによって作成することができる。1つのPCR反応は、オリゴGMCSFDFA（5' GAGCCAGTCCAGGAGGAGTCCCAAATATGGTCCCCCA-3'）（配列番号76）およびBB82を使用できる。二次PCR反応は、オリゴGMCSFDFD（5' -ACCATATTTGGACTCCTCCT GGACTGGCTCCCAGCA-3'）（配列番号77）およびBB91を使用できる。これらのPCR反応から得られる産物を、ゲル精製し、混合し、そしてオリゴBB82およびBB91を用いた三次PCR反応に付すことができる。およそ1150bp PCR産物を、ゲル精製し、HindIIIおよびSacIIで

消化し、～675bpHindIII/SacII断片をゲル精製し、そして仔ウシ腸のホスファターゼで処理した、同様に切断したプラスミドpcDNA3.1::GM-CSF-IgG4-Fcにクローニングした。修正挿入物を有するクローンは、DNA配列決定によって同定することができる。

【0157】

GM-CSF-IgG融合タンパク質の生物活性は、TF-1細胞株（アメリカンタイプカルチャーコレクション（American Type Culture Collection）から入手可能）を用いて測定することができる。

【0158】

8. C. GM-CSF-IgG融合タンパク質のインビボ効力

GM-CSFは、正常および好中球減少症のヒトおよび動物における顆粒球形成および循環中の好中球レベルにおける増加を刺激する。ヒトGM-CSF-IgG融合タンパク質の効力は、タンパク質の注射が循環している好中球レベルの経時的な増加を刺激する非ヒト霊長類（Donahueら、1986a、1986b；Mayerら、1987a、1987b）およびイヌ（Schueningerら、1989；Mayerら、1990）で測定することができる。あるいは、ここに記載されるものと類似のIgG融合タンパク質は、マウスGM-CSF（Goughら、1984；1985；Kajigayaら、1986；Cantrellら、1985）およびヒトGM-CSFシステイン突然変異タンパク質について記載されるとおり、発現および精製されたタンパク質を利用することができる。タンパク質のインビトロ生物活性は、ネズミNFS60またはDA-3細胞株を用いて測定することができる。マウスGM-CSF-IgG融合タンパク質の効力は、日当たり1回、1日おき、または3日毎のネズミGM-CSF-IgG融合タンパク質についての投与スケジュールを用いて、200mg/kgの用量でシクロホスファミドの注射（Mayerら、1991；Gamba-Vitaloら、1991）により好中球減少症になったマウスで測定することができる。0.5μg/kg～50μg/kgの範囲に及ぶGM-CSF-IgG融合タンパク質の用量を試験することができる。

【0159】

9. 幹細胞因子-IgG融合タンパク質

9. A. 幹細胞因子(SCF)のクローニング: SCFは、造血先祖細胞の発生を調節する。ヒトSCFをコードするcDNAは、HepG2、5637またはHT-1080細胞株から単離されたRNAを用いてRT-PCRにより増幅することができる(Martinら、1990; HepG2および5637細胞株は、ATCC、メリーランド州ロックビル所在(Rockville, MD)から入手可能である)。PCR反応は、順方向プライマーSCF-F(5'-CGCAAGCTTGCCACCATGAAGAAGACACAAACT-3') (配列番号78) および逆方向プライマーSCF-R(5'-CGCGGATCTCCGGAGTGTAGGCTGGAGTCTCCAGG-3') (配列番号79)を用いて行うことができる。プライマー中のSCF DNA配列は、下線が付される。プライマーSCF-Fは、SCF分泌シグナルについてのコード配列の5'末端にアニールし、そして逆方向プライマーSCF-Rは、SCFコード配列の3'末端にアニールし、細胞外および膜貫通ドメインの接合部で始まる。他の逆方向PCRプライマーは、適切なヌクレオチドを、SCF-Rで列記されるSCF DNA配列に置換することによって、SCF細胞外ドメインの切断形態、特に成熟タンパク質のAla-174に続いて終止する形態を作成するために使用することができる。得られたPCR産物は、HindIIIおよびBamHIで消化され、ゲル精製し、そしてHindIIIおよびBamHIで消化されたpCDNA3.1(+)ベクターに入れてクローニングし、アルカリホスファターゼ処理し、そしてゲル精製することができる。いくつかのクローンは、修正DNA配列を用いて、あるものを同定するために配列決定されることができる。IgG1-Fc、IgG4-Fc、IgG1-C_H、IgG4-C_Hおよびカッパ軽鎖定常部は、実施例1および5に記載されるとおりSCFの細胞外ドメインのカルボキシ末端に融合されることができる。細胞株TF-1(Kitamura、1989; アメリカンタイプカルチャーコレクション、メリーランド州ロックビル所在(American Type Culture Collection, Rockville, MD)から入手可能)は、SCF-IgG融合タンパク質の生物活性を測定するために使用することができる。

【0160】

種々のIgGドメインに対するSCFの細胞外ドメインの直接融合体は、EP O-IgGおよびG-CSF-IgG直接融合体を構築するために実施例4に記載されるものと類似の操作を使用して構築することができる。SCF-IgG1-Fc直接融合体は、DNA鋳型としてプラスミドp cDNA3.1::SCF-IgG1-Fc7AAを使用するPCRによって作成することができる。1つのPCR反応は、オリゴSCFDFF (5'-GACTCCAGCCTACACGAGCCCAAATCTTGTGACAAA-3') (配列番号80) およびBB82を使用できる。二次PCR反応は、オリゴSCFDFR (5'-ACAGATTTGGGCTCGTGT AGGCTGGAGTCTCCAGG-3') (配列番号81) およびBB91を使用できる。これらのPCR反応から得られる産物を、ゲル精製し、混合し、そしてオリゴBB82およびBB91を用いた三次PCR反応に付すことができる。PCR産物を、ゲル精製し、Hind IIIおよびSac IIで消化し、そして仔ウシ腸のホスファターゼで処理した、同様に切断したp cDNA3.1::SCF-IgG1-Fc7AAにクローニングすることができる。修正挿入物を有するクローンは、DNA配列決定によって同定することができる。

【0161】

SCF-IgG4-Fc直接融合体は、DNA鋳型としてプラスミドp cDNA3.1::SCF-IgG4-Fc7AAを使用するPCRによって作成することができる。1つのPCR反応は、オリゴSCFD FC (5'-GACTCCAGCCTACACGAGTCCAAATATGGTCCCCCA-3') (配列番号82) およびBB82を使用できる。二次PCR反応は、オリゴSCFD FD (5'-ACCATATTTGGACTCGTGTA GGCTGGAGTCTCCAGG-3') (配列番号83) およびBB91を使用できる。これらのPCR反応から得られる産物を、ゲル精製し、混合し、そしてオリゴBB82およびBB91を用いた三次PCR反応に付すことができる。PCR産物を、ゲル精製し、Hind IIIおよびSac IIで消化し、そして仔ウシ腸のホスファターゼで処理した、同様に切断したp cDNA3.1::SCF-IgG4-

Fc7AAにクローニングすることができる。修正挿入物を有するクローンは、DNA配列決定によって同定することができる。

【0162】

10. Flt-3L-IgG融合タンパク質：Flt-3L (Lymanら、1993; Hannumら、1994) は、造血幹細胞の発生を調節する膜結合サイトカインである。ヒトFlt-3LをコードするcDNAは、クロンテック社 (CLONTECH) およびストラタジーン社 (Stratagene, Inc.) のような商業源から入手可能な成人または胎児の肝臓、腎臓、心臓、肺または骨格筋から製造された一本鎖cDNAからPCRによって増幅することができる。PCR反応は、順方向プライマーfltF (5' -CGCAAGCTTGCCACCATGACAGTGCTGGCGCCAGCC-3') (配列番号84) および逆方向プライマーfltR (5' -CGCGGATCCTCCGGAAGGGGGCTGCGGGGCTGTCCG-3') (配列番号85) を用いて行うことができる。プライマー中のFlt-3L DNA配列は、下線が付される。プライマーfltFは、Flt-3L分泌シグナルについてのコード配列の5'末端にアニールし、そして逆方向プライマーfltRは、Flt3コード配列の3'末端にアニールし、細胞外および膜貫通ドメインの接合部で始まる。他の逆方向PCRプライマーは、適切なヌクレオチドを、プライマーfltRで列記されるFlt-3L DNA配列に置換することによって、Flt-3L細胞外ドメインの切断形態を作成するために使用することができる。得られたPCR産物は、HindIIIおよびBamHIで消化され、ゲル精製し、そしてHindIIIおよびBamHIで消化されたpCDNA3.1 (+) ベクターに入れてクローニングし、アルカリ性ホスファターゼ処理し、そしてゲル精製しうる。いくつかのクローンは、修正DNA配列を用いて、あるものを同定するために配列決定することができる。IgG1-Fc、IgG4-Fc、IgG1-CH、IgG4-CHおよびカップ軽鎖定常部は、実施例1および5に記載されるとおりFlt-3Lの細胞外ドメインのカルボキシ末端に融合することができる。ヒトFlt-3レセプターで形質移入されたBa/F3細胞 (Lymanら、1993; Hannumら、1994) は、Flt-3L-IgG融合タンパク質

の生物活性を測定するために使用することができる。Ba/F3細胞は、ジャーマンコレクション・オブ・マイクロオーガニズムズ・アンド・セルカルチャーズ、ドイツ国ブラウンシュweig所在 (the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany) から入手可能である。

【0163】

種々のIgGドメインに対するFlt-3Lの細胞外ドメインの直接融合体は、EPO-IgGおよびG-CSF-IgG直接融合体を構築することについての実施例4に記載されるものと類似の操作を使用して構築することができる。Flt-3L-IgG1-Fc直接融合体は、DNA鋳型として上に記載されるプラスミドpCDNA3.1::Flt-3L-IgG1プラスミドを使用するPCRによって作成することができる。1つのPCR反応は、オリゴFltDFA (5'-GCCCCGCAGCCCCCTGAGCCCAA TCTGTGACAAA-3') (配列番号86) およびBB82を使用できる。二次PCR反応は、オリゴFlt3DFB (5'-ACAAGATTTGGGCTCAGGGGCTGCGGGGCTGTCTGG-3') (配列番号87) およびBB91を使用できる。これらのPCR反応から得られる産物を、ゲル精製し、混合し、そしてオリゴBB82およびBB91を用いた三次PCR反応に付すことができる。PCR産物を、ゲル精製し、HindIIIおよびSacIIで消化し、そして仔ウシ腸のホスファターゼで処理した、同様に切断したpCDNA3.1::SCF-IgG1-Fc7AAにクローニングしうる。修正挿入物を有するクローンは、DNA配列決定によって同定することができる。

【0164】

Flt-3L-IgG4-Fc直接融合体は、DNA鋳型としてプラスミドpCDNA3.1::Flt3-IgG4-Fc7AAを使用するPCRによって作成することができる。1つのPCR反応は、オリゴFltDFC (5'-GCCCGCAGCCCCCTGAGTCCAAATATGGTCCCCCA-3') (配列番号88) およびBB82を使用できる。二次PCR反応は、オリゴFltDFD (5'-ACCATATTTGGACTCAGGGGGCTGCG

G G G C T G T C G G - 3') (配列番号 89) および B B 91 を使用できる。これらの P C R 反応から得られる産物を、ゲル精製し、混合し、そしてオリゴ B B 82 および B B 91 を用いた三次 P C R 反応に付すことができる。P C R 産物を、ゲル精製し、H i n d I I I および S a c I I で消化し、そして仔ウシ腸のホスファターゼで処理した、同様に切断した p c D N A 3. 1 : : S C F - I g G 4 - F c 7 A A にクローニングすることができる。修正挿入物を有するクローンは、DNA 配列決定によって同定することができる。

【0165】

(実施例 11)

多量体サイトカインおよび増殖因子融合タンパク質

生物活性融合タンパク質は、この出願に記載される増殖因子およびサイトカインの多量体融合タンパク質を構築することによっても作成することができる。これらの多量体融合タンパク質は、第2増殖因子/サイトカインタンパク質が、I g G ドメインに置換されることができる以外は、I g G 融合タンパク質について記載されるとおりに構築することができる。2つの増殖因子/サイトカインは、2つの増殖因子/サイトカインの間のリンカーのアミノ酸と一緒に、またはアミノ酸なしで連結せらる。適切なペプチドリンカーとしては、実施例 1 および 4 に記載されるものが挙げられる。融合タンパク質は、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ホモ多量体 (同じ増殖因子/サイトカインの3つまたはそれ以上のコピーを含む) またはヘテロ多量体 (2つまたはそれ以上の異なる増殖因子/サイトカインを含む) であることができる。大部分のカルボキシ末端サイトカイン/増殖因子ドメインは、タンパク質の自然のシグナル配列を欠失し、そして所望の場合、成熟タンパク質配列の第一アミノ酸に先行する短いペプチドリンカー配列を添加する P C R のような操作を使用して修飾されることができる。リンカー配列としては、アミノ末端サイトカイン/増殖因子ドメインに結合することを容易にする制限酵素部位を挙げられるであろう。多量体融合タンパク質で、そのタンパク質のアミノまたはカルボキシ末端にないサイトカイン/増殖因子ドメインは、自然のシグナル配列および終止コドンに欠失し、そして所望の場合、ペプチドリンカーを、そのタンパク質のアミノおよびカルボキシ末端に添加するように修飾さ

ることができる。融合タンパク質は、形質移入に続くC O S細胞中で発現され、精製され、そしてインビトロバイオアッセイで適切に試験されうる。融合タンパク質は、実施例12に記載されるとおり、哺乳類細胞のような安定に形質転換した真核生物の細胞でも発現することができる。

【0166】

(実施例12)

安定に形質転換された真核生物の細胞におけるI g G融合タンパク質および多量体増殖因子/サイトカインの発現

前述の実施例に記載されたI g G融合タンパク質および多量体サイトカイン/増殖因子は、十分に確立した操作を用いて昆虫細胞または哺乳類細胞のような安定に形質転換された真核生物の細胞でも発現することができる。その後、I g G融合タンパク質および多量体サイトカイン/増殖因子は、調製培地から精製される。安定に形質転換されたCHO細胞株は、組換えタンパク質の高レベル発現のために広範に使用される(Geisseら、1996; Trillら、1995)。CHO細胞において、染色体が組み込まれた異種遺伝子の高レベル発現は、遺伝子増幅によって達成することができる。一般に、目的の遺伝子は、増幅が選択性であるマーカー遺伝子に連結される。増幅についての選択を提供する多様な遺伝子は、記載された(Kaufman、1990)が、ネズミのジヒドロホレートレダクターゼ(d h f r)は、頻繁に使用される。この遺伝子の増幅は、ホレート類似メソトレキセート(MTX)に対する耐性を付与し、そして耐性のレベルは、d h f r遺伝子コピー数で増加する(Altら、1978)。MTX選択の利用性は、d h f rに欠乏しているCHO細胞株の利用性によって増強される(Ur laubおよびChasin、1980)。

【0167】

当業者は、ネズミd h f r遺伝子を、G418に耐性を供与するネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(NPT)遺伝子を含む、商業的に入手可能なpCDNA3.1発現ベクター(インビトロジェン(Invitrogen))に組み込むI g G融合タンパク質または多量体サイトカイン/増殖因子についての発現ベクターを構築することができる。ネズミd h f r発現ベクターp d h f r 2.

9は、アメリカンタイプカルチャーコレクション(カタログ番号37165)から入手可能である。このdhfr遺伝子は、dhfr-CHO細胞株で選択でき、そしてMTX耐性についての標準選択によって増幅することができる(Crouseら、1983)。dhfrコード配列は、~900bpBgIII断片としてpdhfr2.9から切断でき、そして発現ベクターpREP4(インビトロジェン)のポリリンカーの独特なBamHI部位にクローニングすることができる。この構築物は、CHO細胞で機能することが知られている(Triller、1995)、強力なRSVプロモーターの下流に、そしてSV40から由来するポリアデニル化部位の上流に遺伝子を位置決めするであろう。その後、このdhfr発現カセットは、SalI部位が、プロモーターおよびポリA付加部位を密接に側面を接するので、SalI断片としてpREP4から切断されることができる。オリゴヌクレオチドリンカーを使用して、このSalI断片は、pCDNA3.1の独特なBgIII部位にクローニングされ、それによりpCDNA3.1(+):dhfr+を作成することができる。IgG融合タンパク質または多量体サイトカイン/増殖因子をコードするDNAは、その後、CMVプロモーターの制御下でこのpCDNA3.1(+)誘導体のポリリンカー領域にクローニングすることができる。例えば、EPO-IgG1-FcまたはG-CSF-IgG1-Fc遺伝子は、HindIII-XbaI断片のようにそれぞれ、プラスミドpBBT180およびpBBT174から切断され、そしてHindIII-XbaI-切断pCDNA3.1(+):dhfr+にクローニングすることができる。他の独特な制限酵素部位は、これらの制限酵素部位が、目的の遺伝子に存在する場合に使用することができる。あるいは、pCDNA3.1(+):dhfr+、およびIgG融合タンパク質または多量体サイトカイン/増殖因子を発現するpCDNA3.1誘導体の同時形質移入は、目的のタンパク質を発現するdhfr+CHO細胞株を得るために使用することができる(Kaufmann、1990)。

[0168]

内毒素を含まないプラスミドDNAは、COSまたはdhfr-CHO細胞のような哺乳類細胞を形質移入するために好ましい。Dhfr-CHO細胞株は、

コロンビア大学のL. Chasin博士(CHO K1 DUKX B11)のような多くの源から、またはアメリカンタイプカルチャーコレクション(CHO duk、ATCC番号CRL-9096)から得られる。細胞は、10% FBS、グルタミン、グリシン、ヒポキサンチン、およびチミジンで補足したF12/DMEM培地(Lucasら、1996)で培養することができる。電気穿孔法によるか、または販売者のプロトコルおよび/または文献に記載されるもの(Kaufman、1990)を用いて、リポフェクトアミン(LipofectAMINE)(ギブコ・ビーアールエル(Gibco BRL))のような当業者に周知の形質移入試薬を使用することによって、形質移入を行うことができる。7%透析FCSで補足され、そしてグルタミン、グリシン、ヒポキサンチン、およびチミジンを欠くF12/DMEM(Lucasら、1996)中でdhfr⁺形質移入物を選択することができる。あるいは、G418耐性(pCDNA3.1のNPT遺伝子によってコードされる)について選択し、続いて、dhfr⁺表現型についての形質移入体をスクリーニングすることができる。Dhfr⁺クローンは、選択培地中で拡張され、そして培養上清は、増殖因子またはサイトカイン(アール・アンド・ディー・システムズ社、エンドジェン社(Endogen, Inc.)およびダイアグノスチック・システムズ・ラボラトリーズ社(Diagnostic Systems Laboratories)によって入手可能)に特異的な、商業的に入手可能なELISAキット、または適切な抗血清(アール・アンド・ディー・システムズ社、エンドジェン社およびダイアグノスチックシステムズラボラトリーズ社によって入手可能)を用いたウエスタンブロットを使用して、IgG融合タンパク質または多量体サイトカイン/増殖因子の発現についてスクリーニングすることができる。その後、IgG融合タンパク質または多量体サイトカイン/増殖因子を発現するクローンは、保存され、そしてKaufman(1990)によって記載されるとおり薬剤濃度を増加するとき、MTX耐性についての複数経路の選択に付することができる。各経路のMTX選択の後、個々のクローンは、IgG融合タンパク質または多量体サイトカイン/増殖因子の発現について試験することができる。これらの操作は、文献に十分に記載され、そしてCHO細胞での多様な異種タンパク質を発現するた

めに使用されてきた (K a u f m a n、1990で検討された)。

【0169】

I g G融合タンパク質は、C H O細胞の調節培地から精製されることができる。遠心分離によるC H O細胞の除去の後、I g G融合タンパク質は、実施例2に記載されるものと類似のプロトコールを用いてプロテインAアフィニティークラムクロマトグラフィーによって上清から精製され、続いて必要とされる場合、さらなるクロマトグラフィー工程に付すことができる。二量体I g G-F cおよびI g G-C_H融合体は、サイズ排除クロマトグラフィーによってさらに精製して、単量体および凝集物を除去することができる。さらなるカラムクロマトグラフィー工程としては、ブルーセファロース (B l u e S e p h a r o s e)、ヒドロキシアパタイト、逆相、疎水性相互作用、およびイオン交換クロマトグラフィーが挙げられる。これらの手法は、当業者に周知である。

【0170】

多量体サイトカイン／増殖因子およびサイトカイン／増殖因子軽鎖定常部融合体は、C H O細胞の調節培地からも精製されることができる。遠心分離によるC H O細胞の除去後、多量体サイトカイン／増殖因子およびサイトカイン／増殖因子軽鎖定常部融合体は、当業者に周知の手法を用いて、カラムクロマトグラフィーにより上清から精製することができる。これらのカラムクロマトグラフィー工程としては、ブルーセファロース、ヒドロキシアパタイト、逆相、疎水性相互作用、サイズ排除およびイオン交換クロマトグラフィーが挙げられる。タンパク質は、サイトカイン／増殖因子または軽鎖定常部に特異的なモノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーによっても精製することができる。

【0171】

【表13】

References

- Aggarwal, B.B. (1998) Human Cytokines. Handbook for Basic and Clinical Research. Volume III. Blackwell Science, Malden, MA.
- Aggarwal, B.B. and Gutterman, J.U. (1992) Human Cytokines. Handbook for Basic and Clinical Research. Volume I. Blackwell Science, Malden, MA.
- Aggarwal, B.B. and Gutterman, J.U. (1996) Human Cytokines. Handbook for Basic and Clinical Research. Volume II. Blackwell Science, Malden, MA.
- Alt, F.W., Kellems, R.E., Bertino, J.R., and Schimke, R.T. (1978) *J. Biol. Chem.* 253:1357-1370.
- Avanzi, G. C., Lista, P., Giovino, B., Miniero, R., Saglio, G., Benetton, G., Coda, R., Cattoretti, G. and Pegorara, L. (1988) *Br. J. Haematology* 69: 359 - 356.
- Baldwin, M.D., Zhou, X.J., Ing, T.S. and Vaziri, N.D. (1998) *ASAIJ* 4: 44-47.
- Balkwill, F.R., Goldstein, L. and Stebbing, N. (1985) *Int. J. Cancer* 35: 613-617.
- Balkwill, F.R. (1986) *Methods Enzymology* 119: 649-657.
- Bartley, T.D., Bogenberger, J., Hunt, P., Li, Y.-S., et al. (1994) *Cell* 77: 1117-1124.
- Bazan, F. (1990) *Immunology Today* 11: 350-354.
- Bazan, J.F. (1991) *Cell* 65: 9-10.
- Bazan, J.F. (1992) *Science* 257: 410-411.
- Blatt, L.M., Davis, J.M., Klein, S.B. and Taylor, M.W. (1996) *J. Interferon and Cytokine Research* 16: 489-499.
- Boissel, J.-P., Lee, W.-R., Presnell, S.R., Cohen, F.E. and Bunn, H.F. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 15983-15993.
- Cantrell, M.A., Anderson, D. and Cerretti, D.P. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6250-6254.
- Capon, D.J., Chamow, S.C., Mordenti, J., Marsters, S.A., Gregory, T., Mitsuya, H., Byrn, R.A., Lucas, C., Wurm, F.M., Groopman, J.E., Broder, S. and Smith, D.H. (1989) *Nature* 337: 525-531.
- Chamow, S.M. and Ashkenazi, A. (1996) *Trends in Biotech.* 14: 52-60.
- Chen, T.T., Tao, M.-H. and Levy, R. (1994) *J. Immunology* 153: 4775-4787.

- Clark, R., Olson, K., Fuh, G., Marian, M., Mortensen, D., Teshima, G., Chang, S., Chu, H., Mukku, V., Canova-Davis, E., Somers, T., Cronin, M., Winkler, M. and Wells, J. A. (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 21969-21977.
- Cox, G.N. and McDermott, M.J. (1994) *WO 9412219*.
- Cox, G.N., McDermott, M.J., Merkel, E., Stroh, C.A., Ko, S.C., Squires, C.H., Gleason, T.M. and Russell, D. (1994) *Endocrinology* 135: 1913-1920.
- Crouse, G.F., McEwan, R.N., and Pearson, M.L. (1983) *Mol. Cell. Biol.* 3:257-266.
- Dangl, J.L., Wensel, T.G., Morrison, S.L., Stryer, L., Herzberg, L.A. and Oi, V.T. (1988) *EMBO J.* 7: 1989-1994.
- DeNoto, F.M., Moore, D.D. and Goodman, H.M. (1981) *Nucleic Acids Research* 9: 3719-3730.
- Derynck, R., Content, J., DeClercq, E., Volckaert, G., Tavernier, J. DeVos, R. and Fiers, W. (1980) *Nature* 285: 542-547.
- de Sauvage, F.J., Hass, P.E., Spencer, S.D., Malloy, B.E. et al. (1994) *Nature* 369: 589-596.
- Dikov, M. M., Reich, M.B., Dworkin, L., Thomas, J.W., and Miller, G.G. (1998) *J. Biol. Chem.* 273: 15811-15817.
- Donahue, R.E., Wang E.A., Stone, D.K., Kamen, R., Wong, G.G., Sehgal, P.K., Nathan, D.G. and Clark, S.C. (1986a) *Nature* 321:872-5
- Donahue, R.E., Wang, E.A., Kaufman, R.J., Foutch, L., Leary, A.C. and Witte-Giannetti, J.S. (1986b) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51: 685-692.
- Elliot, S.G. and Byrne, T.E. (1995) *European Patent Application # 94112732.6*
- Ellison, J., Buxbaum, J. and Hood, L. (1991) *DNA* 1: 11-18.
- Ellison, J.W., Berson, B.J. and Hood, L.E. (1982) *Nucleic Acids Research* 10: 4071-4079.
- Evinger, M. and Pestka, S. (1981) *Methods Enzymology* 79: 362-368.
- Foster, D.C., Sprecher, C.A., Grant, F.J., Kramer, J.M. et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 13023-13027.
- Gamba-Vitalo, C., DiGiovanna, M.P., and Sartorelli, A.C. (1991) *Blood Cells* 17:193-205.
- Geisse, S., Gram, H., Kleuser, B. and Kocher, H.P. (1996) *Prot. Express. Purif.* 8:271-282.
- Gillies, S.D., Young, D., Lo, K.-M. and Roberts, S. (1993) *Bioconjugate Chem.* 4: 230-235.
- Gray, P.W., Leung, D.W., Pennica, D., Yelverton, E., Najarian, R., Simonsen, C.C., Derynck, R., Sherwood, P.J., Wallace, D.M., Berger, S.L., Levinson, A.D. and Goeddel, D.V. (1982) *Nature* 295: 503-508.
- Greenspan, F.S., Li, C.H., Simpson, M.E. and Evans, H.M. (1949) *Endocrinology* 45:455-463.
- Gough, N.M., Metcalf, D., Gough, J., Grail, D. and Dunn, A.R. (1985) *EMBO J.* 4: 645-53.
- Gough, N.M., Gough, J., Metcalf, D., Kelso, A., Grail, D., Nicola, N.A., Burgess, A.W. and Dunn, A.R. (1984) *Nature* 309:763-7.
- Hangoc, G., Yin, T., Cooper, S., Schendel, P., Yang, Y.-C. and Broxmeyer, H.E. (1993) *Blood* 81: 965-972.

- Hannun, C., Culpepper, J., Campbell, D., McClanahan, T., Zurawski, S. et al. (1994) *Nature* 368: 643-648
- Hanzazono, Y., Hosoi, T., Kuwaki, T., Matsuki, S., Miyazono, K., Miyagawa, K., and Takaku, F. (1990) *Exp. Hematol.* 18: 1097-1103.
- Henco, K., Brosius, J., Fujisawa, A., Fujisawa, J.-I., Haynes, J.R., Hochstadt, J., Kovacic, T., Pasek, M., Schambock, A., Schmid, J., Todokoro, K., Walchli, M., Nagata, S. and Weissman, C. (1985) *J. Mol. Biol.* 185: 227-260.
- Hieter, P., Max, E., Seidman, J., Maizel, J. and Leder, P. (1980) *Cell* 22: 197-207.
- Horisberger, M.A. and Di Marco, S. (1995) *Pharmac. Ther.* 66: 507-534.
- Horoszwicz, J.S., Leong, S.S. and Carter, W.A. (1979) *Science* 206: 1091-1093.
- Horton, R.M. (1993) in "Methods in Molecular Biology", White, B.A., ed. (Humana Press, Totowa, NJ) 15:214-250.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. eds. (1990) "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" (Academic Press, San Diego, CA).
- Isaacs, J.D., Greenwood, J. and Waldmann, H. (1998) *J. Immunol.* 161:3862-3869.
- Johns, T.G., Mackay, I.R., Callister, K.A., Hertzog, P.J., Devenish, R.J. and Linnane, A.W. (1992) *J. Natl. Cancer Institute* 84: 1185-1190.
- Kajigaya, S., Suda, T., Suda, J., Saito, M., Miura, Y., Iizuka, M., Kobayashi, S., Minato, N. and Sudo, T. (1986) *J. Exp. Med.* 164:1102-113.
- Kang, S.-H., Na, K.-H., Park, J.-H., Park, C.-I., Lee, S.-Y. and Lee, Y.-I. (1995) *Biotechnology Letters* 17: 687-692.
- Kaufman, R.J. (1990) *Meth. Enzymol.* 185:537-566.
- Kaszbowska, W., Zhang, H., Patterson, R.L., Suhar, T.S. et al., (2000) *Protein Expression and Purification* 18: 213-220.
- Kaushansky, K., Lok, S., Holly, R.D. et al., (1994) *Nature* 369: 568-571.
- Knauf, M.J., Bell, D.P., Hirtzer, P., Luo, Z.-P., Young, J.D., and Katres, N.V. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:15064-15070.
- Kozak, M. (1991) *J. Biol. Chem.* 266: 19867-19870.
- Kubota, N., Orita, T., Hattori, K., Oh-eda, M., Ochi, N. and Yamazaki, T. (1990) *J. Biochem.* 107: 486-492.
- Kuga, T., Komatsu, Y., Yamasaki, M., De4kine, S., Miyaji, H., Nishi, T., Sato, M., Yokoo, Y., Asano, M., Okabe, M., Morimoto, M. and Itoh, S. (1989) *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 159: 103-111.
- Landolfi, N.F. (1991) *J. immunology* 146: 915-919.
- Landolfi, N.F. (1994) U.S. patent number 5,349,053.
- LaRochele, W.J., Dirsch, O.R., Finch, P.W., Cheon, H.-G., May, M., Marchest, C., Pierce, J.H. and Aaronson, S.A. (1995) *J. Cell Biol.* 129: 357-366.
- Leonard, J.P., Quinto, C.M., Kozicz, M.K., Neben, T.Y. and Goldman, S.J. (1994) *Blood* 83: 1499-1506.

- Lewis, J.A. (1987) Chapter 6. Lymphokines and Interferons: A Practical approach. Eds: Clemens, M.J., Morris, A.G. and Gearing, A.J.H., IRL Press Ltd, Oxford, England.
- Lewis, J.A. (1995) Chapter 9: Antiviral activity of cytokines. pp. 129-141.
- Lin, F.-K., Suggs, S., Lin, C.-H., Browne, J.K., Smalling, R., Egrie, J.C., Chen, K.K., Fox, G. M., Martin, F., Stabinsky, Z., Badrawi, S.M., Lai, P.-H. and Goldwasser, E. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7580-7584.
- Lindner, D.J. and Borden, E.C. (1997) J. Interferon and Cytokine Research 17:681-693.
- Linsley, P.S., Brady, W., Grosmaire, L., Aruffo, A., Danle, N.K. and Ledbetter, J.A. (1991a) J. Exp. Med. 173: 721-730.
- Linsley, P.S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L.S., Danle, N.K. and Ledbetter, J.A. (1991b) J. Exp. Med. 174:561-569.
- Lok, S., Kaushansky, K., Holly, R.D., et al. (1994) Nature 369: 565-568.
- Lu, H.S., Clogston, C.L., Nishi, L.O., Merewether, L.A., Pearl, W.R. and Boone, T.C. (1992) J. Biol. Chem. 267: 8770-8777.
- Lu, Z.-Y., Zhang, X.-G., Gu, Z.-J., Yazukawa, K., Amiot, M., Etrillard, M., Bataille, R. and Klein, B. (1994) J. Immunol. Methods 173: 19026.
- Lucas, B.K., Giere, L.M., DeMarco, M.A., Shen, A., Chisolm, V., and Crowley, C.W. (1996) Nucleic Acids Res. 24:1774-1779.
- Lyman, S.D., James, L., Vanden Bos, T., de Vries, P. et al. (1993) Cell 115:1157-1167.
- Mahmood, I. (1998) Life Sciences 63:2365-2371.
- Mark, D.F., Lu, S.D., Cressley, A.A., Yamamoto, R. and Lin, L.S. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 5662-5666.
- Marshall, J.A., Halliwell, R.A., Baxter, J.D. and Goodman, H.M. (1979) Science 205: 602-607.
- Martin, F.H., Suggs, S.V., Langley, K.E., Lu, H.S., Ting, J., Okino, K.H., Morris, F.C., McNiece, I.K., Jacobsen, F.W., Mendiaz, E.A., Birkett, N.C. et al., (1990) Cell 63: 203-211.
- Matsumoto, T., Endoh, K., Kamisango, K., Akamatsu, K., Koizumi, K., Higuchi, M., Imai, N., Misui, H. and Kawaguchi, T. (1990) Br. J. Haematol. 75: 463-468.
- Mayer, P., Lam, C., Obenaus, H., Lichl, E., and Besemer, J. (1987a) Ann N Y Acad Sci 511:17-29.
- Mayer, P., Lam, C., Obenaus, H., Lichl, E., and Besemer, J. (1987b) Blood 70:206-13.
- Mayer, P., Schutz, E., Lam, C., Krick, F., and Lichl, E. (1991) J. Infect. Dis. 163:584-590.
- Mayer, P., Werner, F., Lam, C., and Besemer, J. (1990) Exp. Hematol. 18:1026-1033.
- McKinley, D., Wu, Q., Yang-Feng, T. and Yang, Y.-C. (1992) Genomics 13: 814-819.
- Mohler, K.M., Torrance, D.S., Smith, C.A., Goodwin, R.G., Stremmel, K.E., Fung, V.P., Madani, H. and Widmer, M.B. (1993) J. Immunology 151: 1548-1561.
- Moretti, J., Chen, S.A., Moore, J.A., Ferraiolo, B.L. and Green J.D. (1991) Pharm Res. 8:1351-1359.
- Morton, P.A., Fu, X.-T., Stewart, J.A., Giacoleto, K.S., White, S.L., Leysath, S.E., Evans, R.J., Shieh, J.-J. and Kar, R.W. (1996) J. Immunology 156: 1047-1054.
- Mott, H.K. and Campbell, I.D. (1995) Current Opinion in Structural Biology 5: 114-121.

- Nagata, S. (1994) in *Cytokines and Their Receptors*, N.A. Nicola ed., Oxford University Press, Oxford, pp. 158-160.
- Nagata, S., Tsuchiya, M., Asano, S., Kziro, Y., Yamazaki, T., Yamamoto, O., Hirata, Y., Kubota, N., Oh-eda, M., Nomura, H. and Ono, M. (1986a) *Nature* 319: 415-418.
- Nagata, S., Tsuchiya, M., Asano, S., Yamamoto, O., Hirata, Y., Kubota, N., Oh-eda, M., Nomura, H. and Yamazaki, T. (1986b) *EMBO J.* 5: 575-581.
- Neben, T.V., Loebelenz, J., Hayes, L., McCarthy, K., Stoudmire, J., Schaub, R. and Goldman, S.J. (1993) *Blood* 81: 901-908.
- Oi, V.T., Vuong, T.M., Hardy, R., Reidler, J., Dangel, J., Herzenberg, L.A. and Stryer, L. (1984) *Nature* 307: 136-140.
- Okabe, M., Asano, M., Kuga, T., Komatsu, Y., Yamazaki, M., Yokoo, Y., Itoh, S., Morimoto, M. and Oka, T. (1990) *Blood* 75: 1788-1793.
- Ozes, O.S., Reiter, Z., Klein, S., Blatt, L.M. and Taylor, M.W. (1992) *J. Interferon Research* 12: 55-59.
- Qiu, H., Belanger, A., Yoon, H.-W. P. and Bunn, H.F. (1998) *J. Biol. Chem.* 273: 11179-11176.
- Richter, W.F., Gallati, H., Schiller, C. (1999) *Drug Metabolism and Disposition* 27: 21-25.
- Roitt, I., Brostoff, J. and Male, D. eds. (1989) "Immunology" (Gower Medical Publishing, London, U.K.; New York, N.Y.)
- Roskams, W.G. and Rougeon, F. (1979) *Nucleic Acids Research* 7: 305-320.
- Rowlinson, S.W., Barnard, R., Bastiras, S., Robins, A.J., Brinkworth, R. and Waters, M.J. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 16833-16839.
- Schuening, F.G., Storb, R., Goehle, S., Nash, R., Graham, T.C., Appelbaum, F.R., Hackman, R., Sandmaier, B.M., and Urdal, D.L. (1989) *Exp. Hematol.* 17: 889-894.
- Seeburg, P.H. (1982) *DNA* 1: 239-249.
- Shin, S.-U., and Morrison, S.L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5322-5326.
- Silvennoinen, O. and Ihle, J.N. (1996) *Signalling by Hematopoietic Cytokine Receptors*, R.G. Landes Company, Austin, TX.
- Sohma, Y., Akahori, H., Seki, N., Hori, T., Ogami, K., Kato, T., Shimada, Y., Kawamura, K. and Miyaki, H. (1994) *FEBS Letters* 353: 57-61.
- Souza, L.M., Boone, T.C., Gabrielove, J., Lai, P.H., Zsebo, K.M., Murdock, D.C., Chazin, V.R., Brzuszewski, J., Lu, H., Chen, K.K., Barendt, J., Platzer, E., Moore, M.A.S., Mertelsmann, R. and Welte, K. (1986) *Science* 232: 61-65.
- Stewart, J.D., Lee, L., Posner, B.A. and Benkovic, S.J. (1995) *Meth. Enzymol.* 249: 507-519.
- Steuere, W., Nickerson, P.W., Steele, A.W., Steiger, J., Zheng, X.X. and Strom, T.B. (1995) *J. Immunology* 155: 1165-1174.
- Szykowski, A.J., Lunn, E.D., Davis, K.L., Feldman, L. and Siekman, S. (1998) *PNAS* 95: 1184-1188.
- Trill, J.J., Shatzman, A.R., and Ganguly, S. (1995) *Curr. Opin. Biotechnol.* 6: 553-560.
- Uriaub, G. and Chasin, L.A. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216-4220.
- Vaziri, N.D., Zhou, X.J., and Liao, S.Y. (1994) *Am. J. Physiol.* 266: F360-366.

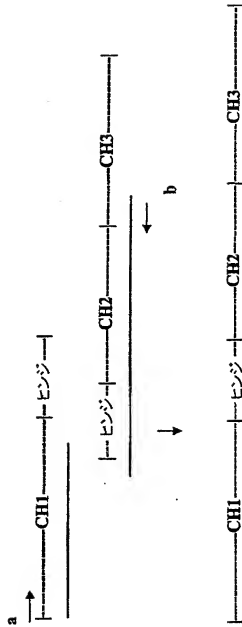
- Wang, G.L. and Semenza, G.L. (1993) *Blood*: 82: 3610-3615.
- Weinstein, Y., Ihle, J.N., Lavus, S. and Reddy, E.P. (1986) *PNAS* 83: 5010-5014.
- Weiss, A., Wiskocil, R.L. and Stobo, J.D. (1984) *J. Immunology* 133: 123-128.
- Wiskocil, R., Weiss, A., Imboden, J., Kamin-Lewis, R.a. and Stobo, J. (1985) *J. Immunology* 134: 1599- 1603.
- Yonemura, Y., Kawakita, M., Masuda, T., Fujimoto, K., and Takatsuki, K. (1993) *Br. J. Haematol* 84: 16-23.
- Zeng, X.X., Steele, A.W., Nickerson, P.W., Steurer, W., Steiger, J. and Strom, T.B. (1995) *J. Immunology* 154:5590-5600.
- Kitamura, T., Tange, T., Terasawa, T., Chiba, S., Kuwaki, T., Miyagawa, K., Piao, Y.F., Miyazono, K., Urabe, A. and Takaku, F. (1989) *J. Cell. Physiol.* 140:323-334.

本発明の種々の実施形態を詳細に説明したが、上記の実施形態の改変および適応が当業者に思い浮かぶことは明白である。しかしながら、そのような改変および適応が本発明の範囲内にあることは明らかに理解される。

【図面の簡単な説明】

【図1】部分的重複（ヒンジ領域の部分）を共有する2つのDNA断片（CH1-ヒンジおよびヒンジーCH2-CH3）のPCRを用いた増幅と、CH1-ヒンジーCH2-CH3を含む大きなDNA断片を生成するためのオリゴヌクレオチドプライマーaおよびbとを示す略図。

【図1】



【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成13年8月15日(2001. 8. 15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】免疫グロブリン(Ig)ドメインに介在ペプチドを用いずにつなげられた可溶性タンパク質を含む融合タンパク質であって、該可溶性タンパク質が、増殖因子、IL-10ではないサイトカイン、およびそれらの活性変異型から成る群より選択され、該免疫グロブリンドメインは可変領域を含まない融合タンパク質。

【請求項2】カルボキシ末端において免疫グロブリンドメインのアミノ末端とつながれた可溶性タンパク質を含む融合タンパク質であって、可溶性タンパク質は、増殖因子、インターロイキン-10(IL-10)でもインターフェロンでもないサイトカイン、およびそれらの活性変異型から成る群より選択され、免疫グロブリンは可変領域を含まず、可溶性タンパク質と免疫グロブリンドメインはAspProGluでもSerでもないペプチドリンカーを介してつながれる、融合タンパク質。

【請求項3】ペプチドリンカーがSerGlyである、請求項2に記載の融合タンパク質。

【請求項4】ペプチドリンカーがSer(GlyGlySer)_nであり、_nが1～7である、請求項2に記載の融合タンパク質。

【請求項5】ペプチドリンカーがSer(GlyGlySer)またはSer(GlyGlySer)₂である、請求項2に記載の融合タンパク質。

【請求項6】IgドメインがIgG-Fc、IgG-CHおよびIgG-CLから成る群より選択される、請求項1～5のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項7】可溶性タンパク質が成長ホルモン（GH）超遺伝子ファミリーのメンバーである、請求項1～5のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項8】前記可溶性タンパク質が顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）である、請求項1～5のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項9】融合タンパク質がG-CSF依存性細胞アッセイにおいて約300ng/ml未満のEC50を有している、請求項8の融合タンパク質。

【請求項10】セリンがG-CSFのシステイン-17と置き換えられた、請求項8の融合タンパク質。

【請求項11】前記可溶性タンパク質が成長ホルモン（GH）である、請求項1～5のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項12】前記可溶性タンパク質が顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、インターロイキン-11（IL-11）、トロンボポエチン（TPO）、肝細胞因子（SCF）、およびflt3リガンドから成る群より選択される、請求項1～5のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項13】介在ペプチドリンカーを用いずにつながれた成長ホルモン（GH）超遺伝子ファミリーのメンバーの2以上のコピーを含むホモ多量体融合タンパク質。

【請求項14】少なくとも1つのペプチドリンカーによりつながれた2以上の成長ホルモン（GH）超遺伝子ファミリーのメンバーの2以上のコピーを含むホモ多量体融合タンパク質であって、GHホルモン超遺伝子ファミリーのメンバーが、成長ホルモン、プロラクチン、胎盤ラクトゲン、トロンボポエチン（TPO）、インターロイキン（IL）-2、インターロイキン-3、インターロイキン-4、インターロイキン-5、インターロイキン-6、インターロイキン-7、インターロイキン-9、インターロイキン-10、インターロイキン-11、インターロイキン-12（p35サブユニット）、インターロイキン-13、インターロイキン-15、オンコスタチンM、毛様体神経栄養因子、白血病抑制因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、 γ -インターフェロン、 ω -インターフェロン、 τ -インターフェロン、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、カルジオ

トロフィニン-1、マクロファージコロニー刺激因子、幹細胞因子およびflt3リガンドから成る群より選択されるホモ多量体融合タンパク質。

【請求項15】GH超遺伝子ファミリーのメンバーが顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)である、請求項13～14のいずれかに記載のホモ多量体融合タンパク質。

【請求項16】ホモ多量体融合タンパク質は二量体G-CSF融合タンパク質である、請求項15に記載のホモ多量体融合タンパク質。

【請求項17】GH超遺伝子ファミリーのメンバーがEPOである、請求項13に記載のホモ多量体融合タンパク質。

【請求項18】多量体融合タンパク質が二量体EPO融合タンパク質である、請求項17または38のいずれか一項に記載のホモ多量体融合タンパク質。

【請求項19】前記GH超遺伝子ファミリーのメンバーが、成長ホルモン、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、 γ -インターフェロン、GM-CSF、IL-11、TPO、SCF、およびFlt3リガンドから成る群より選択される、請求項13～14のいずれか一項に記載のホモ多量体融合タンパク質。

【請求項20】ペプチドリンカーがSerGlyである、請求項13、14、38、または39のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項21】ペプチドリンカーがSer(GlyGlySer)_nであり、nが1～7である、請求項13、14、38、または39のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項22】精製融合タンパク質が二量体であり、単量体融合タンパク質が本質的に存在しない、請求項1または2のいずれか一項に記載の精製融合タンパク質。

【請求項23】可溶性タンパク質が、G-CSF、EPO、およびインターロイキン-11から成る群より選択される、請求項22に記載の精製融合タンパク質。

【請求項24】請求項1、2、13、14、18、または39のいずれか一項に記載の融合タンパク質を生産する方法であって、

(a) 免疫グロブリンと、増殖因子、サイトカインおよびそれらの活性変異型から成る群より選択された可溶性タンパク質とをコードする少なくとも1つの核酸で、宿主細胞を形質移入または形質転換する工程と；

(b) 宿主細胞を培養する工程と；

(c) 宿主細胞によって発現された融合タンパク質を収集する工程と；から成る方法。

【請求項25】前記核酸が、さらにペプチドリinkerをコードしている、請求項24に記載の方法。

【請求項26】請求項1、2、13、14、38、または39のいずれか一項に記載の融合タンパク質をコードする核酸。

【請求項27】融合タンパク質を発現可能な、請求項26の核酸で形質移入または形質転換した宿主細胞。

【請求項28】宿主細胞が真核細胞である、請求項27に記載の宿主細胞。

【請求項29】真核細胞が哺乳類細胞である、請求項28に記載の宿主細胞

。

【請求項30】請求項1、2、13、14、38、または39のいずれか一項に記載の融合タンパク質を精製する方法であって、

(a) 融合タンパク質を含有する組成物を得る工程と；

(b) カラムクロマトグラフィーにより混在物質から融合タンパク質を分離する工程と；
から成る方法。

【請求項31】サイズ排除クロマトグラフィーによって融合タンパク質を混在物質から分離する、請求項30に記載の方法。

【請求項32】成長ホルモン（GH）超遺伝子ファミリーのメンバーにより治療可能な症状を治療する方法であって、有効量の請求項1、2、13、14、38、または39のいずれか一項に記載の融合タンパク質を、それを必要とする患者に投与する工程から成る方法。

【請求項33】融合タンパク質はG-C-S-F-免疫グロブリン融合タンパク質であり、前記症状は血液中の好中球の欠乏である、請求項32に記載の方法。

【請求項34】融合タンパク質はEPO-免疫グロブリン融合タンパク質であり、前記症状はヘマトクリットの欠乏である、請求項32に記載の方法。

【請求項35】請求項1、2、13、14、38、または39のいずれか一項に記載の融合タンパク質を薬学的に許容可能な担体中に加えた状態で含有する医薬組成物。

【請求項36】可溶性タンパク質がエリスロポエチン(EPO)である、請求項1または2のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項37】可溶性タンパク質が、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、 γ -インターフェロン、 ω -インターフェロン、 τ -インターフェロンから成る群より選択される、請求項1に記載の融合タンパク質。

【請求項38】少なくとも1つのペプチドリンカーによりつながれたエリスロポエチンの2以上のコピーを含み、該ペプチドリンカーはGly3-7ではない、ホモ多量体融合タンパク質。

【請求項39】少なくとも1つのペプチドリンカーによりつながれた成長ホルモン超遺伝子ファミリーの2以上の異なるメンバーを含む多量体融合タンパク質であって、前記成長ホルモン超遺伝子ファミリーのメンバーは、成長ホルモン、プロラクチン、胎盤ラクタゲン、エリスロポエチン(EPO)、トロンボポエチン(TPO)、インターロイキン(IL)-2、インターロイキン-3、インターロイキン-4、インターロイキン-5、インターロイキン-6、インターロイキン-7、インターロイキン-9、インターロイキン-10、インターロイキン-11、インターロイキン-12(p35サブユニット)、インターロイキン-13、インターロイキン-15、オンコスタチンM、毛様体神経栄養因子、白血病抑制因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、 γ -インターフェロン、 ω -インターフェロン、 τ -インターフェロン、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、カルジオトロフィニン-1、マクロファージコロニー刺激因子、幹細胞因子およびflt3リガンドから成る群より選択される多量体融合タンパク質。

【請求項40】単量体融合タンパク質から二量体タンパク質を精製する工程をさらに含む、請求項24に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/19336										
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(C) : A61K 35/55, 39/00; C07K 16/00/100 US CL : 424/134.1, 185.1, 192.1, 431/69.7, 530/287.3, 351, According to International Patent Classification (IPC) or to both national classifications and IPC												
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/134.1, 185.1, 192.1, 431/69.7, 530/287.3, 351, Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) West, US Patent & STN via modline, biosis, explus, embase, Search terms: fusion, hybrid, chimera, immunoglobulin, cytokine, growth factor, epo, gm-csf, il-6, gamma, linker peptide												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X - Y	SHU et al. Generation and characterization of a single-gene encoded single-chain immunoglobulin-interleukin-2 fusion protein. Immunotechnology. 1995, Vol. 1, Nos. 3-4, pages 231-241, especially see abstract and page 233, column 1.	1-6 ----- 24										
X - Y	CURTIS et al. Enhanced hematopoietic activity of a human granulocyte macrophage colony stimulating factor-interleukin 3 fusion protein. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. July 1991, Vol. 88, pages 5809-5813, see page 5809, column 2.	16-18, 21 ----- 19,										
X - Y	US 5,723,125 A (CHANG et al.) 03 March 1998 (02.03.98), see abstract and column 2, lines 34-44.	1-6, 24 ----- 25										
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See parent family entry.												
<table border="0"> <tr> <td>* Special categories of cited documents:</td> <td>*¹ Documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the applicant but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>*¹ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>*² Documents of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>*² earlier documents published on or after the international filing date</td> <td>*³ documents of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combinations being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>*³ documents which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)</td> <td>*⁴ documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> </tr> <tr> <td>*⁴ documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>*⁵ documents available to the same patent family</td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:	* ¹ Documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the applicant but cited to understand the principle or theory underlying the invention	* ¹ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	* ² Documents of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	* ² earlier documents published on or after the international filing date	* ³ documents of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combinations being obvious to a person skilled in the art	* ³ documents which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)	* ⁴ documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	* ⁴ documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	* ⁵ documents available to the same patent family
* Special categories of cited documents:	* ¹ Documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the applicant but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
* ¹ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	* ² Documents of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
* ² earlier documents published on or after the international filing date	* ³ documents of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combinations being obvious to a person skilled in the art											
* ³ documents which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)	* ⁴ documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed											
* ⁴ documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	* ⁵ documents available to the same patent family											
Date of the actual completion of the international search 28 SEPTEMBER 2000		Date of mailing of the international search report 14 NOV 2000										
Name and mailing address of the ISAUS Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, DC. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer <i>Forza Hamud</i> FORZA HAMUD Telephone No. (703) 308-0196										

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/19336

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 7-14, 22, 23, 26-37
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet(1)) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IS00/19336

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indications, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98/38212 A2 (GENETICS INSTITUTE, INC.) 03 September 1998 (03.09.98), see entire document.	1-6, 15-21, 24-25

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)*

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	メモード (参考)
A 6 1 P	31/12	C 0 7 K	16/18
	35/00		19/00
C 0 7 K	16/18	C 1 2 N	1/15
	19/00		1/19
C 1 2 N	1/15		1/21
	1/19	C 1 2 P	21/02
	1/21	C 1 2 R	1:91
	5/10	C 1 2 N	15/00
C 1 2 P	21/02	A 6 1 K	37/02
//(C 1 2 P	21/02	C 1 2 N	5/00
C 1 2 R	1:91)		A

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, C A, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, K E, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, R U, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA01 BA03 BA21 BA22
 BA26 BA30 BA61 CA04 CA07
 DA02 EA04 GA11
 4B064 AG02 AG03 AG06 AG08 AG13
 AG18 AG26 CA10 CA19 CC24
 DA01
 4B065 AA90X AA93Y AB01 AC14
 BA02 CA24 CA44
 4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 BA41
 BA44 CA53 DA01 DA12 DA14
 DA15 DA16 DA17 DA18 DA19
 DA22 DA23 DA24 DA27 DA39
 DB22 DB50 DB56 NA14 ZA022
 ZA512 ZA532 ZA552 ZB262
 ZB332
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA40 CA40
 DA01 DA11 DA12 DA13 DA15
 DA31 DA75 EA20 EA24 EA28
 EA29 FA72 FA74 GA21

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成19年9月6日(2007.9.6)

【公表番号】特表2003-508023(P2003-508023A)

【公表日】平成15年3月4日(2003.3.4)

【出願番号】特願2001-509211(P2001-509211)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
A 6 1 P	7/00	(2006.01)
A 6 1 P	7/04	(2006.01)
A 6 1 P	25/00	(2006.01)
A 6 1 P	31/12	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
C 0 7 K	16/18	(2006.01)
C 0 7 K	19/00	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 P	21/02	(2006.01)
A 6 1 K	38/00	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 R	1/91	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
A 6 1 P	7/00	
A 6 1 P	7/04	
A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	35/00	
C 0 7 K	16/18	
C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 P	21/02	C
A 6 1 K	37/02	
C 1 2 N	5/00	A
C 1 2 P	21/02	C
C 1 2 R	1:91	

【手続補正書】

【提出日】平成19年7月13日(2007.7.13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】免疫グロブリン(Ig)ドメインに介在ペプチドを用いずにつながれた

可溶性タンパク質を含む融合タンパク質であって、該可溶性タンパク質が、成長ホルモン、プロラクチン、胎盤ラクタゲン、エリスロポエチン、トロポポエチン、インターロイキン-2 (I L-2)、I L-3、I L-4、I L-5、I L-6、I L-7、I L-9、I L-11、I L-12 (p35サブユニット)、I L-13、I L-15、オンコスタチンM、毛様体神経栄養因子、白血病抑制因子、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、マクロファージコロニー刺激因子、カルジオトロフィン-1、幹細胞因子およびf l t 3リガンド、およびそれらの活性変異型から成る群より選択された成長ホルモン (GH) 超遺伝子ファミリーのメンバーである、該免疫グロブリンドメインは可変領域を含まない融合タンパク質。

【請求項2】カルボキシ末端において免疫グロブリンドメインのアミノ末端とつながれた可溶性タンパク質を含む融合タンパク質であって、可溶性タンパク質は、成長ホルモン、プロラクチン、胎盤ラクタゲン、エリスロポエチン、トロポポエチン、インターロイキン-2 (I L-2)、I L-3、I L-4、I L-5、I L-6、I L-7、I L-9、I L-11、I L-12 (p35サブユニット)、I L-13、I L-15、オンコスタチンM、毛様体神経栄養因子、白血病抑制因子、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、マクロファージコロニー刺激因子、カルジオトロフィン-1、幹細胞因子およびf l t 3リガンド、およびそれらの活性変異型から成る群より選択された成長ホルモン (GH) 超遺伝子ファミリーのメンバーであり、免疫グロブリンは可変領域を含まず、可溶性タンパク質と免疫グロブリンドメインはグリシン、セリン、アラニンおよびスレオニンの残基から選択された1-50のアミノ酸の混合物から成る、融合タンパク質。

【請求項3】ペプチドリinkerが2-7のアミノ酸残基の混合物から成り、該アミノ酸残基がグリシンおよびセリンから選択される、請求項2に記載の融合タンパク質。

【請求項4】ペプチドリinkerがSer G l yである、請求項2に記載の融合タンパク質。

【請求項5】ペプチドリinkerがSer G l y G l y Serである、請求項2に記載の融合タンパク質。

【請求項6】ペプチドリinkerがSer (G l y G l y Ser)である、請求項2に記載の融合タンパク質。

【請求項7】I gドメインがI g G-F c、I g G-C HおよびI g G-C Lから成る群より選択される、請求項1-6のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項8】前記成長ホルモン超遺伝子ファミリーのメンバーがエリスロポエチンである請求項1-6のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項9】前記成長ホルモン超遺伝子ファミリーのメンバーが顆粒球コロニー刺激因子である請求項1-6のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項10】前記成長ホルモン超遺伝子ファミリーのメンバーがインターロイキン-11である請求項1-6のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項11】請求項1-6のいずれか一項に記載の融合タンパク質をコードする単離核酸。

【請求項12】請求項1-6のいずれか一項に記載の融合タンパク質を生産する方法であって、

(a) 請求項1-6のいずれか一項に記載の融合タンパク質をコードする核酸で、宿主細胞を形質移入または形質転換する工程と；

(b) 宿主細胞を培養する工程と；

(c) 宿主細胞によって発現された融合タンパク質を収集する工程と；から成る方法。

【請求項13】請求項1-6のいずれか一項に記載の融合タンパク質を精製する方法であって、

(a) 請求項1-6のいずれか一項に記載の融合タンパク質を含有する組成物を得る工程と；

(b) カラムクロマトグラフィーにより混在物質から融合タンパク質を分離する工程と

；
から成る方法。

【請求項14】サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、金属キレート化クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよび固定化染料アフィニティークロマトグラフィーから選択されたカラムクロマトグラフィーにより融合タンパク質を混在物質から分離する、請求項13に記載の方法。